Aus dem Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Institut für Neuropathologie
Leiter: Prof.Dr.Dr. h.c. J. Cervós-Navarro
und
aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof.Dr. F. Körber

AN DIE REVERSE TRANSKRIPTION IN VIVO ADAPTIERTES cDNA-SYNTHESEVERFAHREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Malgorzata Blumenstock
aus Warschau

1986

UNIV.
LEIPZIG
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0068

Aus dem Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Institut für Neuropathologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Cervós-Navarro

und

aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. F. Körber

AN DIE REVERSE TRANSKRIPTION IN VIVO ADAPTIERTES cDNA-SYNTHESEVERFAHREN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Malgorzata Blumenstock

aus Warschau

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Cervós-Navarro

Korreferent: Prof. Dr. G. Schultz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24. 11. 1986

ZUSAMMENFASSUNG

Das Enzym - reverse Transkriptase - besitzt neben der Aktivität einer RNA abhängigen DNA-Polymerase auch die einer Ribonuclease H und die einer DNA abhängigen DNA-Polymerase.

Die Folge davon ist, daß die als Matrize dienende RNA während der cDNA-Synthese exonucleolytisch gespalten werden kann. Das Enzym benötigt dazu ein zugängiges, mit einem Desoxyribonucleotid gepaartes 5'-oder 3'-Ende der RNA.

Zur Protektion der 5'-terminalen Abschnitte der Poly(A)RNA-Moleküle wurde der folgende Weg entwickelt:

Intermolekulare T_4RNA-Ligase-Reaktion mit Poly(A)RNA als Donor und 5' -d(TCGAGGCrArArA) - 3' als Akzeptor mit nachfolgender kovalenter Bindung der Poly(A)RNA über das angekoppelte Oligonucleotid als Zwischenstück an die Plasmid-DNA.

Ein Schutz der 3'-Enden von Poly(A)RNA-Molekülen wird erreicht, wenn diese (3'-Enden) während der cDNA-Synthese einzelsträngig bleiben.
Aus diesem Grund wurde die reverse Transkription unter der Verwendung von zufälligen Startermolekülen, statt von solchen mit (dT)-Sequenz durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	7
1.1.	Anhang I	13
1.1.1.	Aufbau der Poly(A)RNA	13
2.	Kernisolierung aus verschiedenen Nervenzellen	16
2.1.	Einführung	16
2.2.	Methoden	19
2.2.1.	Kernisolierung aus Körnerzellen des cerebellären Cortex	20
2.2.2.	Kernisolierung aus Pyramidenzellen des telencephalen Cortex	21
2.3.	Ergebnisse (2.3.1.; 2.3.2.)	23 23
3.	Präparation von Poly(A)RNA aus Kernen der Körnerzellen	24
3.1.	Prüfung der Funktion von Poly(A)hnRNA (Translation in vitro)	26
4.	'Cap'Spaltung	27
4.1.	Einführung	27
4.2.	Methoden	31
4.2.1.	'Cap'Spaltung mit Poly(A)hnRNA als Substrat (Orientierung über die verschiedenen 5'-Enden der RNA)	33
4.2.2.	Indirekter Nachweis der 'cap'Spaltung über die Abhängigkeit der Phosphat-Austausch-Reaktion von Nucleosiddiphosphaten	33

4.2.3.	Effizienz der beiden 'cap'spaltenden Enzyme (TAP und T_4Polynucleotid-Kinase)	34
4.3.	Ergebnisse	35
	(4.3.1.; 4.3.2.; 4.3.3.)	35
4.4.	Diskussion	37
	(4.4.1.; 4.4.2.; 4.4.3.)	37
5.	T_4RNA-Ligase-Reaktionen	40
5.1.	Einführung	40
5.2.	Einführung zum Methodenteil	44
5.3.	Methoden	47
5.3.1.	Intermolekulare T_4RNA-Ligase-Reaktion mit MS2-RNA-Fragmenten und $r(A)_{12-18}$ als Substrate	48
5.3.2.	Intermolekulare T_4RNA-Ligase-Reaktion mit Poly(A)hnRNA als Donor und $d(N)_7r(A)_3$ als Akzeptor	49
5.4.	Ergebnisse	50
	(5.4.1.; 5.4.2.)	50
5.5.	Diskussion	54
5.6.	Anhang II	56
5.6.1.	Partielle Spaltung der RNA vom Bakteriophagen MS2 mit der Ribonuclease T_1	56
5.6.2.	Anwendung der Oligo(dT)Cellulose zur Abtrennung der ungebundenen $d(N)_7r(A)_3$-Moleküle nach der T_4RNA-Ligase-Reaktion	58
5.6.2.1.	Einführung	58
5.6.2.2.	Methoden	59

5.6.2.2.1.	Bindung der $[^{32}P]$-Poly(A)hnRNA an die Oligo(dT)Cellulose	60
5.6.2.2.2.	Verhalten von $[^{32}P]$-$d(N)_7r(A)_3$ auf der Oligo(dT)Cellulose-Säule	61
5.6.2.3.	Ergebnisse	62
	(5.6.2.3.1.; 5.6.2.3.2.)	62
5.6.2.4.	Diskussion	63
6.	Reverse Transkription (Einführung zum Methodenteil)	64
6.1.	Reverse Transkription mit Poly(A)hnRNA als Matrize und Hexanucleotiden als zufällige 'primer'Moleküle	65
6.2.	Ergebnisse	66
6.3.	Diskussion	67
7.	Modifiziertes cDNA-Syntheseverfahren	69
7.1.	Einführung	69
7.2.	Schema zum cDNA-Syntheseverfahren	71
7.3.	Diskussion	72
8.	Literaturverzeichnis	75
9.	Anhang III	81
9.1.	Material	81
9.2.	Abkürzungen	82

1. EINLEITUNG

Vergleicht man die Zellen eines multizellulären Organismus, so lassen sie sich wie folgt charakterisieren:

1. In dem, was sie könnten, sind sie gleich (jede verfügt über das gleiche Genom);

2. In dem, was sie zur eigenen Lebenserhaltung tun, sind sie ähnlich;

3. In dem, was sie für das Zell-Kollektiv tun, sind sie spezifisch.

Erkenntnisse darüber, wie Zellen ihren Platz im Organismus finden, wie sie zur Differenzierung, das heißt zur Erlangung einer zellspezifischen Leistung und Morphologie gebracht werden, sind für das Verständnis von Regulationsvorgängen auf molekularer Ebene von entscheidender Bedeutung.
Die modernen Methoden der Molekularbiologie: Rekombination und Klonierung von Nucleinsäuren, Transfer und Expression klonierter Gene in Empfängerzellen eröffnen den Weg zu derartigen Erkenntnissen.
Als Ausgangsmaterial für spätere Gentransferexperimente bietet sich die Poly(A)mRNA an; sie spiegelt die in Punkt 2 und 3. angesprochenen Leistungen der Zellen wider.
Mit dieser Wahl wird der Weg von der mRNA zur doppelsträngigen DNA zur Notwendigkeit. Er beginnt mit der Synthese der zur mRNA komplementären einzelsträngigen DNA, der cDNA.
Eine cDNA-Synthese in vivo findet statt, wenn es zur Infektion einer Zelle mit einem RNA-Tumorvirus kommt.
Beim 'uncoating'Prozess wird dann die reverse Transkriptase

aus dem Viruscore freigesetzt, und da dieses Enzym neben der Aktivität einer RNA abhängigen DNA-Polymerase auch die einer Ribonuclease H und die einer DNA abhängigen DNA-Polymerase besitzt, laufen dann folgende Schritte in der infizierten Zelle ab.:

Im ersten Schritt wird die genomische RNA des Virus abgelesen und die cDNA synthetisiert; im zweiten wird die im RNA·DNA-Hybrid vorliegende virale Ribonucleinsäure gespalten und im dritten der zweite DNA-Strang synthetisiert.
(Die entstandene doppelsträngige DNA wird zum Zellkern transportiert und kann ins Wirtsgenom integriert werden).

Im folgenden sollen die beiden ersten Schritte näher beschrieben werden, denn aus ihnen ergeben sich Konsequenzen für die cDNA-Synthese in vitro.
(Als Beispiel dient hier Moloney's Leukose-Sarkomvirus der Muridae).

Schritt 1.:

Für den Start der cDNA-Synthese wird ein 'primer'Molekül benötigt. Diese Funktion wird von der $tRNA^{Phe}$ erfüllt, die 150 Nucleotide distal vom 5'-Ende der viralen RNA an diese bindet. Die reverse Transkription beginnt dann am 3'-Ende der tRNA, so daß zuerst das 5'-Ende des cDNA-Moleküls entsteht.
Das fertige, 150 Nucleotide lange cDNA-Molekül wird zusammen mit der gebundenen tRNA vom 5'-Ende der viralen Ribonucleinsäure gelöst und bindet dann direkt vor der Poly(A)-Sequenz, also nahe dem 3'-Ende erneut an die Virus-RNA. Jetzt wird das cDNA-Molekül verlängert und die reverse Transkription läuft so lange, bis das ganze RNA-Molekül des Virus, bis auf die 150 Nucleotide an seinem 5'-Ende, abgelesen wird. Für das fertige cDNA-Molekül ergibt sich eine Länge von ungefähr 8×10^3 Nucleotiden.

Schritt 2.:

Die im Hybrid mit der cDNA vorliegende virale RNA wird von der reversen Transkriptase (Ribonuclease H Aktivität) gespalten. Das Enzym benötigt dazu ein zugängiges, mit einem Desoxyribonucleotid gepaartes 3'-oder 5'-Ende der RNA (47.). Es erfüllt dann die Funktion einer Exoribonuclease und als Spaltprodukte entstehen Oligoribonucleotide mit 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden.

Die angedeutete zeitliche Trennung der cDNA-Synthese von der exonucleolytischen Spaltung der RNA wird im viralen System tatsächlich erreicht, denn bis auf das kurzfristig bestehende cDNA-RNA-Hybrid (150 Nucleotide lang am 5'-Ende der viralen RNA) bleiben während der cDNA-Synthese beide RNA-Enden (5' und 3') einzelsträngig und somit das RNA-Molekül unangreifbar.
[Der Übergang von Schritt 1. zu Schritt 2. ist noch nicht ganz geklärt, auch sind die Schritte 2. und 3. nicht eindeutig voneinander getrennt (28.; 38.; 54.; 85.; 86.; 87.)]

Aus der beschriebenen cDNA-Synthese in vivo ergibt sich folgendes für in vitro Systeme:

1. Es werden 'primer'Moleküle benötigt.
2. Wird die als Matrize dienende RNA nicht während der cDNA-Synthese geschützt, kann die reverse Transkription nicht von der exonucleolytischen Spaltung der RNA getrennt werden.
   [Die Trennung der beiden beschriebenen Schritte von der Synthese des zweiten DNA-Stranges kann durch Antibiotika (Actinomycin D) erreicht werden].

UNIV. LEHMBI BIBL.

ad 1.
Bei der cDNA-Synthese in vitro wird meistens Poly(A)RNA, die aus eukaryoten Zellen isoliert wurde, als Matrize eingesetzt.
[Zum Aufbau der Poly(A)RNA siehe 1.1.1.].
Verständlicherweise werden dann Oligo- oder Polynucleotide mit (dT)-Sequenz als 'primer' verwendet (45.; 46.; 59.; 87.).

Eine zweite Möglichkeit stellen die zufälligen 'primer' Moleküle dar. Es handelt sich dabei um eine Mischung verschiedener Oligodesoxyribonucleotide, in der alle aus den vier zur Verfügung stehenden Basen bildbaren Sequenzen vorkommen (52.; 78.; 84.).
(Nur beim Einsatz von einheitlichen RNA-Molekülen mit bekannter Sequenz als Matrize können spezifische 'primer' Moleküle hergestellt und verwendet werden).

ad 2.
Es sieht so aus, als ob gerade der fehlende Schutz der RNA bei cDNA-Synthesen in vitro den wunden Punkt dieser Verfahren darstellt, denn was die Viren in ihrer, mehrere tausend Nucleotide langen RNA schaffen, gelingt uns kaum mit sehr viel kürzeren Molekülen.
Die Ausbeuten an in vitro erhaltener cDNA liegen bei: 10-20 % (45.); 18 % (67.); 30 % (33.); 5-20 % (78.), zudem erreichen nur wenige der cDNA-Moleküle die volle Länge, das heißt, die Nucleotidanzahl der als Matrize dienenden RNA.

Effiziente Schutzmaßnahmen für die RNA können aus der Arbeit von LEIS, 1973 (47.) abgeleitet werden, aus der folgende Werte stammen:

Polymer	Poly(dT)	% gespalten
[^{3}H]Poly(A)-Poly(C)·Poly(G)	+ -	85 0
Poly(C)-[^{3}H]Poly(A)	+ -	88 6
Cellulose-[5'-^{32}P], [^{3}H]Poly(A)-Poly(C)·Poly(G)	+ -	4,6 0

Verschiedene markierte Polymere wurden mit AMV* reverser Transkriptase und mit oder ohne Poly(dT) inkubiert, die Menge radioaktiver Spaltprodukte (Ribonuclease H Aktivität des Enzyms) anschließend bestimmt.

Aus den Werten ist folgendes ableitbar:

Nur im letzten Fall, in dem das 5'-Ende des Moleküls an Cellulose gebunden war und sein 3'-Ende als RNA·RNA-Hybrid vorlag, konnte die Poly(A)-Sequenz trotz des Poly(A)·(dT)-Hybrids vor der Ribonuclease H Aktivität der reversen Transkriptase geschützt werden.
Im ersten Fall wurde die RNA im Poly(A)·(dT)-Hybrid vom 5'-Ende, im zweiten vom 3'-Ende aus gespalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zur reversen Transkription von Poly(A)RNA unter Schutz gegen die exonucleolytische Spaltung entwickelt.

---

* AMV - 'avian myeloblastosis virus'

Im Zentrum des Verfahrens steht die T_4RNA-Ligase-Reaktion; sie ermöglicht die kovalente Bindung von 5'-Enden von Poly(A)RNA-Molekülen an Plasmide, da diese Methode und auch andere Reaktionen mit verschiedenen Substraten getestet werden mußten, werden im folgenden Teil der Arbeit zuerst die einzelnen Schritte des Verfahrens dargestellt und diskutiert, und zwar entsprechend ihrer späteren Reihenfolge: 'cap'Spaltung, T_4RNA-Ligase-Reaktion, Oligo(dT)Cellulose als Reinigungsschritt nach vorhergehender Reaktion, cDNA-Synthese mit zufälligen 'primer' Molekülen.

Die Isolierung von Zellkernen und Poly(A)hnRNA wird vorangestellt, da letzte als Substrat in verschiedenen Reaktionen eingesetzt wurde.

1.1 ANHANG I

1.1.1. Aufbau der Poly(A)RNA

Poly(A)mRNA

Aus eukaryoten Zellen isolierte Poly(A)mRNA setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Moleküle zusammen.

		Anzahl der verschiedenen Moleküle	
Gewebe:	Gehirn*	$1{,}2 \times 10^5$; $8{,}2 \times 10^4$	(19.; 84.)
	Maus-L-Zellen	$6{,}3 \times 10^3$	(52.)
	HeLa-Zellen	$\approx 10^4$	(35.)
Längen der Moleküle:		330-5100 Nucleotide	(52.)
Durchschnittliche Länge:		1500; 1100-1400	(7.; 19.; 84.)

Ausgehend vom 5'-Ende eines mRNA-Moleküls können folgende Strukturen bzw. Abschnitte unterschieden werden:

1. 'cap' ;
2. nicht codierende Region (20->200 Nucleotide lang);
3. Startcodon der Translation;
4. Proteinsequenz codierender Abschnitt (im Durchschnitt 1200 Nucleotide lang);
5. $r(A)_{100\text{-}200}$

* Poly(A)mRNA wurde aus den gesamten Gehirnen (von Ratten oder Mäusen) isoliert, d.h., viele Zellarten sind in der RNA-Population repräsentiert.

Auf die unter Punkt 1. und 2. genannten Strukturen, die eventuell weniger geläufig sind, soll hier kurz eingegangen werden.

ad 1.

Das 5'-terminale Nucleosid des mRNA-Moleküls ist über eine 5'-5'Triphosphatbrücke mit einem 7-Methylguanosin-Molekül verbunden.

Folgende Einteilung der 'cap'Strukturen wird verwendet:

'cap' 0 : m^7GpppX

'cap' 1 : $m^7GpppXm$* ; m^7Gpppm^6Am**

'cap' 2 : $m^7GpppXmpYm$

Funktion der 'cap'Struktur:
Protektion der 5'-Enden von mRNA-Molekülen vor Exonucleasen;
Promotion der Initiation der Translation.
[Weiteres zur 'cap'Struktur (**66.**; **71.**; **73.**)]

ad 2.

Sequenzen der 5'- nicht codierenden Regionen von 211 verschiedenen mRNA-Molekülen wurden auf Übereinstimmungen untersucht (**43.**), folgendes wurde dabei gefunden:

Prädominanz von Cytidin in Positionen*** -1; -2; -4; -5.
In Position -3 trugen 79% der untersuchten Moleküle Adenosin; 18% Guanosin.

Funktion der Region:
Ribosomenbindungsstelle entsprechend der SHINE-DALGARNO Sequenz der Prokaryonten (**44.**; **40.**)

---

* Methylgruppe in Position 2 des Zuckerrestes des Nucleotids

** Trägt das erste Nucleotid Adenin als Base, kann diese in Position 6 zusätzlich methyliert sein.

*** Vom Startcodon der Translation aus in Richtung 5'-Ende des mRNA-Moleküls.

Poly(A)hnRNA

Zur Länge der Moleküle werden folgende Angaben gemacht:

4500 Nucleotide (30.); 4200-4800 (7.); 3-4faches der Länge von Poly(A)mRNA-Molekülen (31.).

Ihre Komplexität wird mit 3,5fachem der von Poly(A)mRNA angegeben, wobei die Anzahl der verschiedenen Poly(A)hnRNA-Moleküle mit 1×10^5 gleich der von Poly(A)mRNA-Molekülen ist [Gehirne von Mäusen (7.)] .

2. KERNISOLIERUNG AUS VERSCHIEDENEN NERVENZELLEN

2.1. Einführung

Die Begründung für die Wahl spezifischer Nervenzellarten ergibt sich aus dem besonderen Aufbau des Gehirns.

"Most organs of the body are made up of cells that are relatively simple in form and either similar or, at least, obviously complementary in function.
That the brain is organized in this way is by no means evident; the impression is rather the reverse. The brain seems to be made up of a bewildering complexity of parts, and the cells within the parts seem to be characterized by an inscrutable complexity of form, extent, and relationships with each other." (SHEPHERD, 1974) (70.).

Man sollte sich vielleicht klarmachen, daß genauso wie aus den vier verschiedenen rNTPs unterschiedliche RNAs entstehen, aus den Neuronen verschiedene funktionelle Einheiten gebildet werden.

Jede Nervenzelle unterhält über axo-somatische, axo-dendritische, axo-axonale und dendro-dendritische Synapsen zahlreiche Kontakte mit anderen Neuronen.
Die Summe der ankommenden "Informationen" entscheidet, ob ein Impuls über das Axon der Zelle ausgesandt wird.

Eine grobe Unterteilung der Nervenzellen kann nach dem Zielort ihrer Signale vorgenommen werden. Ein Teil der Neurone (z.B. Pyramidenzellen) sendet seine Axone an andere Zentren, es entstehen Assoziations-, Projektions- und Kommissurenfasern.

Andere senden ihre Impulse nur innerhalb des eigenen Zentrums aus, z.B. Körnerzellen des cerebellären Cortex, Neurone der granulären Schichten des Cortex cerebri.

Der Isocortex weist in Bereichen, die überwiegend sensorische Afferenzen empfangen, wie z.B. visueller Cortex, eine stark ausgeprägte Sicht IV auf. Die relative Zunahme der Neurone dieser Schicht im Verhältnis zu den Pyramidenzellen steigt mit phylogenetischem Fortschritt (12.)

Visueller Cortex	Pyramidenzellen	sternförmige* Neurone
Kaninchen	64 - 69 %	28 - 32 %
Katze	57 - 63 %	33 - 37 %
Affe	51 - 54 %	44 - 47 %

Die angeführten Zahlen stammen von MITRA (Department of Anatomy, University College, London)

Hirnrindenregionen, von denen in erster Linie efferente Impulse an den Bewegungsapparat ausgehen, sind wiederum stärker mit Pyramidenzellen versehen (agranulärer Cortex).

Motorischer Cortex	Pyramidenzellen	sternförmige Neurone
Katze	84 - 86 %	8 - 12 %
Affe	73 - 75 %	21 - 23 %

(MITRA)

* Wurde aus dem Englischen - 'stellate cells' - übernommen, im Deutschen werden mehrere Bezeichnungen verwendet.

Zur Isolierung von Gehirnzellen (bzw. Zellkernen) und ihrer Fraktionierung* sind zahlreiche Arbeiten erschienen.
Eine zusätzliche Auftrennung der im Cortex cerebri vorkommenden Nervenzellarten scheint jedoch nicht möglich zu sein.
Infolge der Zusammensetzung des telencephalen Cortex werden bei Isolierungen der Nervenzellen die Pyramidenzellen überwiegen. Will man eine andere Neuronenart erhalten, bietet sich das Kleinhirn als Ausgangsmaterial an.
Der cerebelläre Cortex ist unter anderem aus Purkinjezellen ("entsprechend" den Pyramidenzellen) und Körnerzellen ("entsprechend" den sternförmigen Neuronen) aufgebaut.

Körnerzellen	Purkinjezellen	pro Cerebellum
2×10^8	$3{,}5 \times 10^5$	Ratte
2×10^9	$1{,}2\text{-}1{,}5 \times 10^6$	Katze
$2\text{-}4{,}5 \times 10^{10}$	$1{,}5 \times 10^7$	Mensch

Eine Isolierung aller Zellkerne der Kleinhirnrinde ergibt zu 90 % Kerne der Körnerzellen (50.). [Afferenzen und Funktion der Körnerzellen (6.; 14.; 70.)]

---

* gemeint Trennung der Neurone von Gliazellen

2.2. Methoden

Die Zellisolierung (aus Cortex cerebri bzw. cerebelli) und die Fraktionierung der Zellen in Neurone und Glia sind häufig beschrieben worden (10.; 11.; 15.; 20.; 60.; 68.; 69.; 89.; 90.).

Die Angaben zu erhaltenen Nervenzell-Perikaryen liegen bei 10 % bzw. 11 % der Neurone des Ausgangsgewebes (60.; 69.).

Die einzelnen Zellfraktionen sind meist mit Zellfragmenten bzw. mit Organellen verunreinigt. Während der Präparation werden die Neuronenfortsätze zwangsläufig abgetrennt, an den erhaltenen Perikaryen sind Schädigungen, wie zum Beispiel eine Schwellung der Mitochondrien erkennbar (89.).

Zellkernisolierungen bieten den Vorteil, daß nach der Fraktionierung die Kerne zu 70-80 % einer Zellart angehören, andere Verunreinigungen nicht vorliegen und mehr Material gewonnen wird: 15,5 % (80.); 20-25 % (48.).
[Isolierung und Fraktionierung von Kernen verschiedener Gehirnzellen (4.; 16.; 48.; 50.; 76.; 79.; 80.)]

2.2.1. Kernisolierung aus Körnerzellen des cerebellären Cortex

Lösungen (Endkonzentrationen)

1. 0,9 % NaCl;
2. 0,9 % NaCl; 2,5 mM EDTA;
3. 2,5 M Saccharose; 0,15 mM Spermin; 0,5 mM Spermidin; 2,5 mM EDTA, 15 mM 2-Mercaptoäthanol; 0,5 mM PMSF; 15 mM Tris-HCl (pH 6,8*)
4. 0,25 M Saccharose; 0,25 mM EDTA, 60 mM KCl; 15 mM NaCl; 0,15 mM Spermin; 0,5 mM Spermidin; 15 mM Tris-HCl (pH 7,4).

[Einsatz der Polyamine anstatt divalenter Metallionen in den Lösungen 3. und 4. (**36.**)].
Alle Lösungen wurden vor der Verwendung auf 0° C abgekühlt.

Fünf Kleinhirne von Rindern wurden in Eis transportiert und anschließend in 0,9 % NaCl gespült; der Cortex wurde präpariert und in Lösung 2. aufbewahrt. Die Lösung wurde abgegossen, die Hirnrinde gewogen und 2,5 M Saccharose-lösung (1 ml/g Cortex) hinzugegeben. Das Gewebe wurde im Waring-Mixer (2-3 s lang) aufgeschlossen und anschließend homogenisiert (motorbetriebener Homogenisator nach Potter mit Teflonstempel); die Gewebesuspension wurde durch zwei Lagen Gaze gefiltert und dann die Konzentration von Saccharose im Homogenat auf 2,12 M angehoben.
Die Zentrifugation erfolgte bei 39000 RPM (68000x g_{av}) im Beckman B XIV Zonal-Rotor; 90'; 0-4° C.

---

* Homogenisationsmedium : pH ≤ 6,2 –> Agglutination der Kerne; pH > 6,8 –> Neigung der Kernmembranen zur Ruptur (**48.**).

Die Zellkerne wurden von der Rotorwand abgehoben und in 52 ml Lösung 4. suspendiert; 10 µl davon 1:10 verdünnt und die Anzahl der Kerne in einer Zählkammer mikroskopisch bestimmt.

2.2.2. Kernisolierung aus Pyramidenzellen des telencephalen Cortex

Die Lage des motorischen Cortex bei Rindern konnte aus der Literatur (25.) und mit Hilfe histologischer Präparate einigermaßen genau bestimmt werden. Leider kann diese Region makroskopisch nur schwer von den Nachbargebieten abgegrenzt werden, sie umfaßt Teile mehrerer Gyri, die zudem schmal und stark gewunden sind, auch ist die Tiefenausdehnung (in die Sulci hinein) variabel.

Die Präparation der Hirnrinde sollte möglichst schnell erfolgen, deshalb wurden Cortexgebiete gewählt, die im Zentrum der motorischen Region liegen (die Tiefenausdehnung wurde nicht beachtet).

Lösungen

1. bis 4. siehe Versuch 2.2.1.

Für die Fraktionierung der Zellkerne:

1,8 M; 2,0 M; 2,2 M; 2,4 M und 2,6 M Saccharose jeweils im Puffer entsprechend der Lösung 3. (2.2.1.)

Die Isolierung der Zellkerne aus dem motorischen Cortex von drei Rinder-Großhirnen erfolgte wie im Versuch 2.2.1..

Zwei Ausnahmen:

1. Saccharosekonzentration im Homogenat wurde auf 1,8 M eingestellt;
2. Zentrifugation bei 55000 RPM* im SW 65 Rotor; 10'; 0-4° C.

Für die Fraktionierung der Zellkerne wurden die Zentrifugationsröhrchen am Abend vor der Präparation gefüllt: Jeweils 6,3 ml 2,6 M; 2,4 M; 2,2 M (oben) Saccharoselösung (diskontinuierlicher Gradient).

Das Pellet aus isolierten Zellkernen wurde in 6,3 ml 2 M Saccharoselösung suspendiert und auf die Oberfläche des Zuckergradienten aufgetragen; Röhrchen wurden mit 1,8 M Saccharoselösung aufgefüllt; die Zentrifugation erfolgte bei 22000 RPM** im SW 27 Rotor; 45'; 0-4° C.
Die Zentrifugationsröhrchen wurden in Höhe der sichtbaren Grenze zwischen 2,2 und 2,4 M Saccharose mit einer großlumigen Kanüle durchbohrt, die dort liegenden Zellkerne in eine Spritze aufgenommen und anschließend in 30 ml Lösung 4. aufgeschwemmt; nachfolgend erfolgte die Zentrifugation (Sorvall) bei 2000 x g, 10'; 5° C. Das Pellet wurde in wenigen ml Lösung 4. resuspendiert; 10 µl wurden abgenommen; 1 : 10 verdünnt; die Neuronenkerne gezählt.

---

* 100000 x g
** 65000 x g

2.3. Ergebnisse

2.3.1.

Der von Meningen und weißer Hirnsubstanz befreite Cortex von fünf Kleinhirnen ergab 120 g Gewebe, aus ihm konnten $1,5 \times 10^{10}$ * Zellkerne isoliert werden.

2.3.2.

Von drei Großhirnen konnten 6,3 g an motorischem Cortex präpariert werden.
Nach der Fraktionierung wurden 3×10^{7} * Kerne erhalten, von denen 70-80% bei der Phasen-Kontrast-Mikroskopie die Merkmale von Neuronenzellkernen aufwiesen.
[Zur Morphologie der Zellkerne verschiedener Hirnzellen (42.; 79.; 80.)]
Die Pyramidenzellkerne wurden nach Zugabe von Glycerin eingefroren, die der Körnerzellen zur Poly(A)hnRNA-Präparation verwendet.

---

* Für beide Gewebearten wurden für die Rindergehirne keine Daten zur Zelldichte gefunden, da diese aber bei verschiedenen Tierarten stark variiert (siehe unten), konnten die Ergebnisse nur in der aufgeführten Form wiedergegeben werden.

Mensch : 3×10^{7} Nervenzellen/1 g Cortex cerebri;
Ratte : $1,2 \times 10^{8}$
Mensch : $2-3 \times 10^{8}$ Zellen/1g Cerebellum
Ratte : $3-8 \times 10^{8}$

3. PRÄPARATION VON POLY(A)RNA AUS KERNEN DER KÖRNERZELLEN

Da das dazu notwendige Verfahren aus Standardmethoden* besteht, werden hier die einzelnen Schritte und ihre Ergebnisse nur in Form einer tabellarischen Zusammenfassung aufgeführt:

Schritt	Ausgangsmaterial	durchgeführte Schritte	Ergebnisse
1.	$1{,}5 \times 10^{10}$ Zellkerne	Lysis der Kerne; Entfernung nucleärer Proteine	28,8 mg Nucleinsäuren
2.	28,8 mg Nucleinsäuren	Spaltung der DNA (DNase I); Entfernung von Enzym und DNA-Spaltprodukten	13,8 mg Ribonucleinsäuren
3.	13,8 mg RNA	Fraktionierung der Ribonucleinsäuren auf der Oligo(dT)Cellulose (siehe auch 5.6.2.1.; 5.6.2.2.; 5.6.2.2.1.; 5.6.2.3.1.; 5.6.2.4.)	80,7 µg Poly(A)hnRNA

* Methoden: 1). Isolierung von nucleärer RNA (7.;8.;35.;49.;52.);
2). Purifikation von Poly(A)RNA (5.;8.;19.;41.).

Die Angaben zum DNA-Gehalt der cerebellären Zellkerne liegen bei 7,6 und 6,7 pg/Kern (20.; 50.)
Mit dem Durchschnittswert der beiden ergibt sich:
In 1,5 x 10^{10} Zellkernen müßten 110 mg DNA enthalten sein; 15 mg wurden präpariert, sie entsprechen 13,6 %.

Für Kerne von Großhirnzellen werden folgende Angaben zum RNA/DNA-Verhältnis gemacht: 0,46 und 0,32-0,66 (48.; 4.).
Für cerebelläre Zellkerne: 0,08 (50.).

Aus dem eigenen Ergebnis geht hervor:

RNA : DNA = 0,48 : 1

Nach der Fraktionierung auf der Oligo(dT)Cellulose ergaben sich 80,7 µg Poly(A)hnRNA, diese entsprechen 0,59 % der gesamten nucleären RNA [0,86 % (52.)]

Aus späteren Versuchen ging hervor, daß die präparierte Poly(A)hnRNA-Fraktion noch Verunreinigungen enthielt, so daß insgesamt gesagt werden kann, daß das Verhältnis RNA/DNA für cerebelläre Zellkerne zwischen 0,08 und 0,48 liegt und im eigenen Versuch wahrscheinlich die Spaltung mit der Desoxyribonuclease I nicht ausreichend war.

3.1. Prüfung der Funktion von Poly(A)hnRNA (Translation in vitro)

Ein fertiges Proteinbiosynthesesystem - das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (KRL) von der Firma Amersham - wurde verwendet.

Die Versuchsdurchführung und der Nachweis der synthetisierten Produkte erfolgten nach Angaben der Hersteller.

Da zur Anwendung und Präparation solcher zellfreien Proteinbiosynthesesysteme bereits zahlreiche Arbeiten erschienen sind (51.; 34.; 55.; 56.; 3.), werden hier nur die Versuchsergebnisse zusammengefaßt.

Mit 1 µg Poly(A)hnRNA im Ansatz ergaben sich für die gemessene Radioaktivität* der synthetisierten Produkte folgende Werte:
$3{,}6 \times 10^4$ cpm nach 15; $6{,}5 \times 10^4$ cpm nach 30 und
$8{,}5 \times 10^4$ cpm nach 60 Minuten Reaktionszeit.

[Im Ansatz lagen folgende Konzentrationen vor:
Poly(A)hnRNA 0,05 µg/µl; KRL 0,8 µl/µl; Kaliumionen 98 mM; Magnesiumionen 1,65 mM. Eine Verdopplung der Kaliumionenkonzentration zeigte einen geringen positiven Effekt, alle anderen Veränderungen führten zur Effizienzabnahme].

---

* Die Markierung wurde durch Einbau von L-[^{35}S] Methionin erreicht.

4. 'CAP' SPALTUNG

4.1. Einfuhrung

Das Nucleosid am 5'-Ende der mRNA-Moleküle ist über eine 5'-5'Triphosphatbrücke mit einem m^7Guanosin verbunden, die so gebildete 'cap'Struktur kann mit zwei Enzymen gespalten werden:

1. Mit der aciden Pyrophosphatase aus Tabakmosaikviren -TAP (**24.**; **72.**; **57.**; **71.**),

2. Mit der T_4Polynucleotid-Kinase (**1.**; **2.**).

Beide führen zu mRNA mit 5'-Phosphatenden und m^7GDP, letztes wird von der TAP noch zu m^7GMP und P_i gespalten. Die Effizienz der Enzyme ist in den oben angegebenen Arbeiten getestet worden, wobei radioaktiv markierte RNAs als Substrate verwendet wurden.

Mit isolierter Poly(A)RNA ist der Nachweis der 'cap'Spaltung schwieriger; man muß davon ausgehen, daß ein unbekannter Teil der RNA-Moleküle an ihren 5'-Enden statt der 'cap'Struktur Phosphat- oder Hydroxylgruppen trägt. Eine selektive $[^{32}P]$-Markierung der beiden letzten ist mit der T_4Polynucleotid-Kinase unter normalen Reaktionsbedingungen nicht möglich. Es würde nämlich gleichzeitig die 'cap'Spaltung ablaufen, das dabei entstehende m^7GDP die Dephosphorylierung der RNA fördern und die so gebildeten 5'-Hydroxylgruppen $[^{32}P]$ erhalten.
Insgesamt handelt es sich bei dem beschriebenen Prozeß nur um eine Reaktion, die reversibel ist und über A5'$pppR_{OH}$ (analog zu 'cap') als Zwischenprodukt abläuft.

Die Hinreaktion entspricht der Phosphorylierung, die Rückreaktion der Dephosphorylierung- Letztere ist bei der Phosphat-Austausch-Reaktion (Markierung von 5'-Phosphat tragenden Substraten) geschwindigkeitsbestimmend und kann durch NDPs gefördert werden. Ein Optimum wird bei NDP : NTP≈30 : 1 (62.) erreicht, doch auch dann gilt noch:
Die Geschwindigkeit der Phosphorylierung ist größer als die der Rückreaktion.

Will man also an Poly(A)RNA die erfolgreiche 'cap'Spaltung nachweisen, sind mehrere Ansätze nötig, in denen jeweils bestimmte Teile der T_4Polynucleotid-Kinase-Reaktion gehemmt oder gefördert werden.

Dazu ein Vorschlag:

Wird mRNA zuerst mit der alkalischen Phosphatase* behandelt, tragen ihre Moleküle am 5'-Ende nur noch Hydroxylgruppen oder 'cap'. Eine nachfolgende 'cap'Spaltung mit der T_4Polynucleotid-Kinase führt zu neuen 5'-Phosphatenden; wird dann $[^{32}P]$NTP hinzugegeben und der Ansatz in Eis, statt bei 37° C inkubiert, fällt die Geschwindigkeit der Phosphorylierung auf 1/14 ihres normalen Wertes (bei 37° C) und die der Dephosphorylierung sogar auf 1/86 (62.), das heißt, die Rückreaktion wird stärker gehemmt und dadurch werden die zu Beginn der Reaktionen 'cap'tragenden Moleküle bei der $[^{32}P]$Markierung besonders benachteiligt. Multipliziert man also den bei 0° C erhaltenen Wert mit vierzehn und vergleicht ihn dann mit dem, der bei 37° C erhalten wurde, werden folgende Aussagen ermöglicht:

---

* alkalische Phosphatase vom Kalb-Intestinum (KIAP)

1. mRNA wahrscheinlich verunreinigt oder gespalten
   —> beide Werte hoch,

2. mRNA intakt, 'cap'Spaltung ineffektiv —> beide
   Werte niedrig*,

3. mRNA intakt, 'cap'Spaltung erfolgreich —> der bei
   37° C erhaltene Wert hoch, der andere niedrig.

Nach der Ermittlung des Anteils der mRNA-Moleküle mit 5'-Phosphat und 5'-Hydroxylenden ist eine Unterscheidung der beiden mit Hilfe eines dritten Ansatzes möglich.

Erster Schritt:

'cap'Spaltung mit der T_4Polynucleotid-Kinase,

zweiter Schritt:

[^{32}P]-Einbau über die Phosphat-Austausch-Reaktion bei 37° C.

Sind in der mRNA-Fraktion keine Moleküle mit 5'-Phosphatenden vorhanden, müssen die bei 37° C erhaltenen Werte, mit oder ohne KIAP-Reaktion, ungefähr gleich sein.

Die aufgezählten Ansätze werden im folgenden Versuchsteil näher beschrieben. Sie dienten der Untersuchung vorhandener Strukturen an 5'-Enden von Poly(A)RNA-Molekülen und ermöglichten gleichzeitig die Beurteilung der 'cap'Spaltung. [Zur Sicherung der in solchen Versuchen erhaltenen Ergebnisse kann die Bindung von ^{32}P -Poly(A)RNA an die Oligo(dT)Cellulose untersucht werden].

---

* Sind beide Werte niedrig, sollte auch die Effizienz der Phosphat-Austausch-Reaktion bei 37° C geprüft werden.

Zur weiteren Prüfung der 'cap'Spaltung wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Die 'cap'Spaltung erfolgte mit der T_4Polynucleotid-Kinase und Hämoglobin-mRNA als Substrat. Der Ansatz wurde dann geteilt, zu einer Hälfte $[^{32}P]$NTP hinzugegeben und die Markierung durchgeführt, aus der anderen wurde das entstandene m^7GDP mit Hilfe der Alkoholfällung der RNA entfernt und erst dann der Markierungsansatz zusammengesetzt.
   In einem solchen Versuch wird die 'cap'Spaltung indirekt über die Abhängigkeit der Phosphat-Austausch-Reaktion von NDPs im Ansatz untersucht. Die Größenordnung der genannten Abhängigkeit läßt sich leicht mit anderen Substraten prüfen.

2. Die beiden 'cap'spaltenden Enzyme (TAP und T_4Polynucleotid-Kinase) wurden verglichen.
   Dazu ist folgendes zu sagen:
   Werden mRNA als Substrat und die $[^{32}P]$-Markierung als Reaktionsnachweis verwendet, enthält das Ergebnis aus dem Ansatz mit TAP die Summe der Aktivitäten beider Enzyme ('cap'Spaltung TAP und die T_4Polynucleotid-Kinase im Markierungsansatz).

4.2. Methoden

In den Ansätzen blieben folgende Größen und Reaktionsbedingungen konstant:

1. Als Substrate für die 'cap'Spaltung dienten:

   Hämoglobin-mRNA und Poly(A)hnRNA aus cerebellären Körnerzellen, für die Phosphat-Austausch-Reaktion wurde zusätzlich DNA vom Phagen ØX 174, gespalten mit der Endonuclease Hae III (ergibt Produkte mit gepaarten Enden), eingesetzt.

2. T_4Polynucleotid-Kinase (10 U/µl)
   Von dem Enzym wurden, sowohl bei der 'cap'Spaltung, als auch bei der $[^{32}P]$-Markierung 3-5 Units/pMol Substrat-5'-Enden eingesetzt (Enzymüberschuß).
   Alle Reaktionen verliefen in 50 mM* Tris-HCl (pH 7,6)**; 10 mM $MgCl_2$; 15 mM 2-Mercaptoäthanol.

   Das in den Markierungsansätzen verwendete $[\gamma^{-32}P]$ATP hatte eine spezifische Aktivität von 3 µCi/pMol und wurde im molaren Verhältnis 1-3 : 1 zu Substrat-5'-Enden eingesetzt.

3. Alkalische Phosphatase vom Kalb-Intestinum (KIAP) (25 U/µl)

   Der Einsatz des Enzyms erfolgte mit 12 Units/pMol 5'-Enden, als Puffer diente 50 mM Tris-HCl (pH 8,3). Die Ansätze wurden jeweils 1 h bei 50° C inkubiert, die Reaktionen mit 25 mM EGTA gestoppt.

---

* Alle Angaben zur Pufferzusammensetzung entsprechen Endkonzentrationen.

** pH-Optimum (6,2 - 6,6) der Phosphat-Austausch-Reaktion wurde nicht eingehalten.

4. Tabakmosaikviren acide Pyrophosphatase (TAP) (3 U/µl).

   Diese wurde mit 0,3 U/pMol mRNA eingesetzt [0,03-0,3 U/pMol (24.)] und die Reaktionen in 50 mM Natriumacetat (pH 6); 10 mM 2-Mercaptoäthanol durchgeführt.

5. Zum Nachweis der Effizienz der durchgeführten Reaktionen wurden die jeweils entstandenen Mengen an [^{32}P]-Produkten bestimmt. Dazu wurde von den Markierungsansätzen 2 x 1 µl abgenommen und zu 100 µl (200 µg) Kalb-Thymus-DNA pipettiert und diese dann anschließend zu 2-3 ml eiskalter 10%iger TCA gegeben.
   Nach 30' im Eis erfolgte die Abtrennung der säurelöslichen radioaktiven Verbindungen auf Whatman-GF/C-Filtern, letzte wurden nach dem Trocknen in Szintillationsgefäße mit Bray's-Lösung gegeben und die auf ihnen befindliche Radioaktivität anschließend gemessen.
   Als Leerwerte für die unspezifisch auf den Filtern verbleibende Aktivität wurden Eichlösungen mit entsprechenden [^{32}P]ATP-Konzentrationen eingesetzt.

4.2.1. 'cap'Spaltung mit Poly(A)hnRNA als Substrat (Orientierung über die verschiedenen 5'-Enden der RNA)

2 pMol Poly(A)hnRNA wurden mit KIAP dephosphoryliert und nach durchgeführter Phenolextraktion und Alkoholfällung mit 10 Units T_4Polynucleotid-Kinase 30' bei 37° C inkubiert. Nach erfolgter 'cap'Spaltung wurde der Ansatz geteilt und zu jeder Hälfte wurden 2,5 pMol $[^{32}P]$ATP hinzugegeben. Die Markierung der einen Hälfte erfolgte in Eis, die der anderen bei 37° C.

Zwei weitere pMol Poly(A)hnRNA wurden nach der 'cap'Spaltung (wie oben) über die Phosphat-Austausch-Reaktion in Anwesenheit von 6 pMol $[^{32}P]$ATP und 200 pMol ADP bei 37° C markiert.

4.2.2. Indirekter Nachweis der 'cap'Spaltung über die Abhängigkeit der Phosphat-Austausch-Reaktion von Nucleosiddiphosphaten

Als Substrat dienten 3 pMol Hämoglobin-mRNA und die 'cap' Spaltung erfolgte mit 10 Units T_4Polynucleotid-Kinase, wobei der Ansatz 30' lang bei 37° C inkubiert und danach aufgeteilt wurde.
Zu einer Hälfte des Ansatzes (10µl) wurden 1,5 pMol $[^{32}P]$ATP hinzugegeben und dieser dann, wie oben angegeben, inkubiert.
Aus der anderen Hälfte wurde das Enzym mit Phenol entfernt, die mRNA mit Alkohol gefällt und dann mit Hilfe von 1,5 pMol $[^{32}P]$ATP und 5 Units Enzym markiert.

Abhängigkeit der Phosphat-Austausch-Reaktion von NDPs:

In zwei Ansätzen wurden jeweils 2 pMol 5'-Phosphatenden von DNA ØX 174 mit 10 Units T_4Polynucleotid-Kinase und 3 pMol $[^{32}P]$ATP 30' lang bei 37° C inkubiert, wobei ein Ansatz zusätzlich 2 pMol ADP enthielt.

4.2.3. Effizienz der beiden 'cap'spaltenden Enzyme (TAP und T_4Polynucleotid-Kinase)

Nach der Inkubation (30' bei 37° C) von 1 pMol Hämoglobin-mRNA mit 0,3 Units TAP wurden KIAP und ihr Puffer (10fach konzentriert) hinzugegeben und der Ansatz dann 1 h lang bei 50° C inkubiert.
Danach wurde die mRNA von anderen Reaktionsteilnehmern gereinigt und schließlich mit Hilfe von 5 Units T_4Polynucleotid-Kinase und 1,7 pMol $[^{32}P]$ATP markiert.

In einem zweiten Ansatz wurde 1 pMol Hämoglobin-mRNA im TAP-Puffer (ohne Enzymzugabe) gelöst und dann wie oben weiterbehandelt.

4.3. Ergebnisse

4.3.1.

Die Aktivität von 1 pMol Poly(A)hnRNA nach der Markierung in Eis und vorhergehender Spaltung mit KIAP und T_4Polynucleotid-Kinase betrug 1,57 x 10^5 cpm.
Aus diesem Wert ergibt sich nach Multiplikation und Umrechnung, daß 33 % der vornandenen 5'-Enden der RNA [^{32}P] tragen.
Wurden gleiche Reaktionen mit nachfolgender Markierung bei 37° C durchgeführt, ergab sich nach der Umrechnung der Aktivität (8,6 x 10^6 cpm) ein [^{32}P]-Einbau in 130 % der berechneten Poly(A)hnRNA-Moleküle im Ansatz.

Von 2 pMol Poly(A)hnRNA wurden über die reine Phosphat-Austausch-Reaktion (bei 37° C) in Anwesenheit von ADP 90 % markiert, die Aktivität der Probe betrug 1,2 x 10^7 cpm.

4.3.2.

Die Alkoholfällung bewirkte, daß die Aktivität von [^{32}P]-Hämoglobin-mRNA (1,5 pMol) statt 2,9 x 10^6 cpm nur 1,5 x 10^6 cpm betrug.
Setzt man die 5'-Enden der mRNA im Ansatz gleich 100 %, konnten im ersten Fall 29,4 % und im zweiten 15,2 % von ihnen markiert werden.

Von 2 pMol DNA-5'-Enden wurden ohne ADP nur 5,1 % markiert, 9,7 % mit ADP im Ansatz.

4.3.3.

Nach der Spaltung mit TAP und KIAP konnten 57,5 % der vorhandenen 5'-Enden der Hämoglobin-mRNA markiert werden (Aktivität 4,4 x 10^6 cpm)
Nur mit KIAP und nachfolgender T_4Polynucleotid-Kinase wurde $[^{32}P]$ in 40 % der vorhandenen Moleküle eingebaut.

4.4. Diskussion

4.4.1.

Die drei in diesem Versuch erhaltenen Werte erlauben folgende Aussagen:

1. Der Großteil (≈67 %) der Poly(A)hnRNA-Moleküle hat wahrscheinlich die 'cap'Struktur an ihren 5'-Enden (Wert bei 0° C ≙ 33 %).

2. Es sind Fragmente oder Verunreinigungen mit anderen Nucleinsäuren vorhanden, die 'cap'Spaltung und die Phosphat-Austausch-Reaktion sind effizient (Wert bei 37° C ≙ 130 %).

3. Die Fragmente oder die verunreinigenden Nucleinsäuren tragen, zumindest zum Teil, Phosphatgruppen an ihren 5'-Enden.
   (Wert bei 37° C ≙ 90 %, wenn keine Dephosphorylierung vor der 'cap'Spaltung erfolgte).

ad 2.:

Auf diesen Punkt wurde bereits bei der Diskussion der Bindung von $[^{32}P]$-Poly(A)hnRNA an die Oligo(dT)Cellulose eingegangen (siehe 5.6.2.4.).
Es sei noch vermerkt, daß die hohen $[^{32}P]$-Einbauraten in die Poly(A)hnRNA im Vergleich zur Hämoglobin-mRNA vor allem durch andere $[^{32}P]$ATP-Konzentrationen in den Markierungsansätzen verursacht wurden.
Mit $[^{32}P]$ATP : 5'-Enden der Poly(A)hnRNA = 1 : 1 ergab sich ein Einbau in 38,8 % der Moleküle, unter gleichen Reaktionsbedingungen wurden 29,4 % der Hämoglobin-mRNA-5'-Enden markiert.

Die starke Abhängigkeit der Resultate von der Zusammensetzung der Markierungsansätze macht deutlich, daß nicht die 'cap'Spaltung, sondern die Phosphat-Austausch-Reaktion die Endwerte limitiert.

4.4.2.

In beiden Fällen - RNA und DNA - verhalten sich die erhaltenen Werte - mit bzw. ohne NDPs - wie 2 : 1.

Daraus folgt:
Bei der Inkubation von Hämoglobin-mRNA mit der T_4Polynucleotid-Kinase scheint m^7GDP zu entstehen.
(Der geringere $[^{32}P]$-Einbau in die DNA im Vergleich zu Hämoglobin-mRNA erklärt sich durch die Basenpaare an ihren Enden).

4.4.3.

Zu diesem Versuch muß gesagt werden, daß schon die Spaltung der mRNA mit alkalischer Phosphatase den $[^{32}P]$-Einbau bei nachfolgender Markierung erhöht.
Dieses Enzym hat bei dem Ansatz mit TAP mehr Einfluß als bei der anderen Probe, bei der ja die Dephosphorylierung vor der 'cap'Spaltung erfolgt.
Berücksichtigt man zusätzlich die Summation der beiden 'cap'spaltenden Enzyme in dem Ansatz mit TAP, erscheint die Differenz der beiden Proben von 17,5 % zu klein, um der TAP eine höhere Effizienz zuzusprechen.

Zudem zeigen die Werte des Versuchs 4.2.1., daß die 'cap' Spaltung mit der T_4Polynucleotid-Kinase wahrscheinlich vollständig abläuft.

5. T_4 RNA-LIGASE-REAKTIONEN

5.1. Einführung

Das Enzym katalysiert die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende eines Nucleinsäuremoleküls - des Akzeptors und dem Phosphatrest am 5'-Ende eines anderen Nucleinsäuremoleküls - des Donors. Gleiche Moleküle können miteinander verbunden werden (Polymerisation), ebenso beide Enden eines Moleküls (Zirkularisation) (63.; 82.).

Die Reaktion läuft in drei Schritten ab:

1. Adenylierung des Enzyms
2. Aktivierung des Donors
3. Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen Akzeptor und Donor.

1. $E + ATP \rightleftharpoons E\sim AMP + PP_i$
2. $E\sim AMP + pNpR_{OH} \rightleftharpoons E\sim A5'ppNpR_{OH}$
3. $E\sim A5'ppNpR_{OH} + {}_{HO}XpRp \rightleftharpoons pRpXpNpR_{OH} + E + AMP$

Die Effektivität intermolekularer Reaktionen hängt von vielen Faktoren ab. Folgende spielen eine wichtige Rolle:

1. Aufbau des Akzeptors
2. Aufbau des Donors
3. Konzentrationen und molare Verhältnisse im Ansatz von: Akzeptor : Donor; ATP : Donor bzw. ATP : Enzym; Enzym : Donor

ad 1.:

Am 3'-terminalen Ende des Akzeptors müssen mindestens drei Ribonucleotide stehen. Diese werden vom Enzym erkannt und gegenüber Verbindungen mit Desoxyribose als Zuckerrest bevorzugt. Die Reaktionsfähigkeit von DNA-Akzeptoren beträgt nur 1/200 der von RNA-Molekülen. Bereits ein rNMP-Rest erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich, durch ihn wird eine Verkürzung der Inkubationszeit von 1-10 Tagen auf 2-5 h bei gleicher Ausbeute ermöglicht (13.).

Neben dem Zuckerrest werden auch die Basen am 3'-Ende des Akzeptors vom Enzym erkannt. Es liegt eine Präferenz für Adenin vor, mit anderen Basen nimmt die Effizienz ab, und zwar von I —> C —> U (letzte fast inaktiv) (37.).

Zusätzlich sind der Länge eines effektiven Akzeptors Grenzen gesetzt. Das Optimum liegt bei 5-6 Nucleotiden, eine Verkürzung oder Verlängerung des Moleküls wirkt sich negativ aus. Setzt man die Effizienz von $(N)_{5-6}$ gleich eins, ergibt sich folgendes für Akzeptoren mit anderer Nucleotidanzahl:
0,3 für $(N)_3$; 0,8 für $(N)_{10}$; 0,5 für $(N)_{12-22}$; <0,05 für $(N)_{200}$ (37.).

Soll ein Akzeptor nicht mit sich selbst reagieren, lassen sich die Polymerisation und die Zirkularisation durch Dephosphorylierung des Moleküls hemmen.

ad 2.:

Anscheinend erkennt das Enzym am 5'-Ende des Donors nur das Phosphat, die erste Base und die nachfolgende Phosphodiesterbindung, hier (am 5'-Ende) werden Nucleotide mit C oder U als Base bevorzugt.

Einzelsträngie Moleküle sind von Vorteil, doch ist sogar DNA mit Basenpaaren an ihren Enden als Donor reaktionsfähig (37.), auch die Länge spielt nur eine untergeordnete Rolle. Probleme können mit Donor-Molekülen auftreten, die gleichzeitig gute Akzeptoreigenschaften haben. Die Polymerisation und Zirkularisation müssen dann für eine effiziente intermolekulare Reaktion durch Schutzgruppen am 3'-Ende des Donors verhindert werden.

ad 3.:

Will man zwei verschiedene Moleküle aneinander koppeln und liegt im Ansatz ein molares Verhältnis Akzeptor : Donor = = 1 : 1 vor, sollte die Summe der Konzentrationen beider Moleküle ein Minimum nicht unterschreiten.
[Ein Anheben der Konzentration von 50 µM auf 200 µM führt zur Verdopplung (37.), von 30 µM auf 800 µM zur Verzehnfachung (88.) der Reaktionsausbeuten].
Kann die Konzentration des Donors, insbesondere bei hochmolekularen Verbindungen nicht angehoben werden, muß das Verhältnis von Akzeptor zu Donor geändert werden, der erste ist dann für die Ansatzkonzentration entscheidend.

Neben den bereits aufgezählten Bedingungen ist die zugegebene Enzymmenge (insbesondere für die Reaktionsgeschwindigkeit) von Bedeutung. Sie kann bei effektiven Akzeptor-Donor-Paaren klein sein:
0,45 Units/nMol Donor (81.); 0,43 - 4,2 (58.).

Liegen dagegen im Ansatz Substrate mit schlechten Eigenschaften vor, steigt die benötigte Enzymmenge auf 50-250 Units/nMol Donor (37.).

Zur Bedeutung der molaren Verhältnisse ATP/Donor, ATP/Enzym sind folgende Aussagen wichtig:

Bei geringer Enzymzugabe und großen ATP-Mengen kann - in Ansätzen mit äquimolaren Substratkonzentrationen - der Donor in aktivierter Form aufgestaut und dann vom Enzym abgelöst werden.

Hier gilt:
ATP/Donor≈5/1, dieses hat zur Folge, daß das Verhältnis ATP/Enzym einen Wert von $>10^5$ ergibt. (81.).

In Ansätzen mit Akzeptorüberschuß, in denen meist der Donor in niedriger Konzentration und das Enzym in großer Menge vorliegen, sollte bedacht werden, daß beim Übernehmen des oben genannten ATP/Donor-Verhältnisses, es zum freien (nicht adenylierten) und somit inaktiven Enzym kommen kann.
[Hier gilt:
ATP/Donor = 5000/1 (37.)].

5.2. Einführung zum Methodenteil

Drei Donor- und zwei Akzeptorarten wurden eingesetzt.
Bei der Überprüfung der Reaktionsbedingungen dienten

- Fragmente von MS2-RNA und einzelsträngige DNA: $d(N)_{20}$ als 5'-Phosphat liefernde Verbindungen;
- $r(A)_{12-18}$ Moleküle mit 5'- und 3'-Hydroxylenden als Akzeptoren.

Die aus den Testsystemen erhaltenen Werte wurden für die intermolekulare Reaktion mit Poly(A)hnRNA als Donor und $d(N)_7r(A)_3$ als Akzeptor verwendet.
Auf die Ansätze mit $d(N)_{20}$ soll nicht näher eingegangen werden, sie dienten der ersten Orientierung über den Einfluß der einzelnen Reaktionsteilnehmer.

Zum zweiten Testsystem folgendes:

Als Donor diente MS2-RNA nach Spaltung mit der Ribonuclease T_1 (Reaktion siehe 5.6.1.). Das Enzym führt zu Fragmenten mit 5'-Hydroxyl- und 3'-Phosphatenden. Letzte ermöglichen den Einsatz kurzer RNA-Moleküle in der Reaktion, denn trotz ihrer guten Akzeptoreigenschaften kommt es zu keiner Polymerisation und Zirkularisation.
Die gewählten Längen der Fragmente lagen bei 20-70 Nucleotiden, dieses bringt zwei Vorteile:

1. Die Reaktionsprodukte* können elektrophoretisch von den

---

* Bei Verwendung von Donormolekülen mit $[^{32}P]$ an ihren 5'-Enden können die Reaktionsprodukte über die entstehende Resistenz des $[^{32}P]$ gegen die Dephosphorylierung nachgewiesen werden. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß aktivierte, vom Enzym gelöste Donormoleküle sich wie Produkte verhalten.

Donormolekülen getrennt und anschließend nachgewiesen werden. Dies ist bei Reaktionen mit den zwangsläufig kurzen Akzeptormolekülen und Poly(A)RNA als Donor nicht der Fall.

2. Die unterschiedlichen Längen der MS2-RNA-Fragmente erlauben eine Übersicht über eine unter Umständen doch vorliegende Diskriminierung längerer Donormoleküle in der Reaktion.

In dem Ansatz mit Poly(A)hnRNA als Donor und $d(N)_7r(A)_3$ als Akzeptor ist der Aufbau des letzten von Bedeutung, dazu folgendes:

Nur durch einen gemischten DNA-RNA-Akzeptor werden zwei Dinge gleichzeitig ermöglicht:

1. eine effiziente T_4RNA-Ligase-Reaktion und
2. über die DNA-Sequenz des Akzeptors kann die angekoppelte Poly(A)RNA kovalent an das Plasmid gebunden werden.

Der zweite Punkt ist im Hinblick auf die spätere reverse Transkription von immenser Bedeutung, denn wird die Poly(A)RNA an ein Oligoribonucleotid gekoppelt und dieses dann nur über Wasserstoffbrücken an das Plasmid gebunden, besteht die Gefahr, daß beim Freibleiben seines 5'-Endes das Oligoribonucleotid von der Ribonuclease H (Aktivität der reversen Transkriptase) gespalten und so die Poly(A)RNA vom Plasmid gelöst wird.

In der T_4RNA-Ligase-Reaktion bietet der hier verwendete Akzeptor noch zusätzlich folgende Vorteile:
Mit $(N)_{10}$ liegt er nahe der optimalen Länge, die drei vom Enzym erkannten Nucleotide tragen das Adenin, die bevorzugte Base, und das 5'-Ende des Moleküls ist mit einer Hydroxylgruppe versehen.

Gemischte DNA-RNA-Akzeptoren sind mit Hilfe der terminalen Desoxynucleotidyltransferase und einzelsträngiger DNA* als Substrat herstellbar (21.; 61.; 64.). Einheitliche Längen von rAMP-Resten an den 3'-Enden der DNA-Moleküle erfordern eine anschließende Selektion.
(Unser Akzeptor wurde auf Bestellung von der Firma Pharmacia hergestellt).

---

* Sonst dienen beide 3'-Enden als Substrate des Enzyms.

5.3. Methoden

In den Ansätzen blieben folgende Größen und Reaktionsbedingungen konstant:

1. T_4RNA-Ligase (1,8 U/µl; 1200 U/mg)
   Das Molekulargewicht des Enzyms wird mit 43000 (13.) bzw. 41000 (37.) angegeben. Aus den angeführten Daten ergibt sich: 1 Unit ≙ 20 pMol Enzym.

   Die Reaktionen wurden in 50 mM* HEPES (pH 7,9); 10 mM DTT; 10 mM $MnCl_2$; 0,1 µg/µl Rinderserumalbumin** ausgeführt.

2. Phenolextraktion nach der T_4RNA-Ligase-Reaktion.
   Diese spielt hier deshalb eine Rolle, weil in allen Proben eine Korrelation zwischen der mit H_2O extrahierbaren Radioaktivität und dem Auftreten der Reaktionsprodukte vorzuliegen schien.
   Wurde zum Beispiel $[^{32}P]$-$d(N)_{20}$ als Donor mit $r(A)_{12-18}$ als Akzeptor in der T_4RNA-Ligase-Reaktion eingesetzt, erschienen in der wässrigen Phase der Phenolextraktion 8-16 % der Radioaktivität nach 2 h; 40-66 % nach 5 h Inkubationszeit. Die durchgeführte Elektrophorese zeigte dann eine entsprechende Zunahme der Produkte nach 5 h Reaktionsdauer.
   Die angegebenen Zahlen gelten für die Extraktion mit Phenol/$CHCl_3$/Isoamylalkohol (1/1/0,04) mit nachfolgender warmer (5', 65° C) Reextraktion. Auf das übliche Erhitzen 1-2'; 100° C (88.; 75.) der Ansätze nach Ablauf der Reaktionszeit wurde hier verzichtet.

---

* Ansatzendkonzentrationen

** Vorsicht: Bei manchen Firmen bereits im Aufbewahrungspuffer der T_4RNA-Ligase in so hoher Konzentration enthalten, daß der angebene Ansatzwert nach Enzymzugabe bei weitem überschritten wird.

5.3.1. Intermolekulare T_4RNA-Ligase-Reaktion mit MS2-RNA-Fragmenten und $r(A)_{12-18}$ als Substrate.

Die Reaktion wurde mit 16 pMol $[^{32}P]$-MS2-RNA (Aktivität 4 x 10^6 cpm); 1 nMol $r(A)_{12-18}$; 3 Units T_4RNA-Ligase und 9 nMol ATP im Ansatz durchgeführt. Das Endvolumen betrug 10 µl, die Zeit 5 h, die Temperatur 37° C.

Ein zweiter gleicher Ansatz, nur ohne $r(A)_{12-18}$ als Akzeptor, diente zur weiteren Prüfung des unter Punkt 2, S.47 genannten Zusammenhanges.

Die bei der Phenolextraktion gewonnenen wässrigen Überstände wurden jeweils vereinigt, anschließend mit H_2O verdünnt und 2 x 2 µl von ihnen dann zur Radioaktivitätsmessung verwendet. Die restliche RNA wurde mit Alkohol gefällt und nachfolgend im Elektrophoresepuffer [90 mM Tris-Borat (pH 8,3); 1 mM EDTA (74.; 49.)] mit Urea und Farbstoffen gelöst. Die Auftrennung der Moleküle erfolgte auf einem Polyacrylamidgel.
Neben den zwei Proben aus den T_4RNA-Ligase-Ansätzen wurden zusätzlich $[^{32}P]$-MS2-RNA-Fragmente auf das Gel aufgetragen und dieses dann nach erfolgter Elektrophorese mit Hilfe der Autoradiographie ausgewertet. Die geschwärzten Röntgenfilmbereiche wurden ausgeschnitten und die Intensität der Banden photometrisch bestimmt.

5.3.2. Intermolekulare T_4RNA-Ligase-Reaktion mit Poly(A)hnRNA als Donor und $d(N)_7r(A)_3$ als Akzeptor

2,3 pMol $[^{32}P]$-Poly(A)hnRNA (Aktivität 5,5 x 10^6 cpm) wurden mit 1,8 nMol $d(N)_7r(A)_3$; 2,7 Units T_4RNA-Ligase und 7,5 nMol ATP 5 h lang bei 37° C inkubiert (Endvolumen 20 µl).

Nach erfolgter Phenolextraktion diente ein Teil der H_2O-Überstände zur Radioaktivitätsmessung, zum Rest wurden Natriumacetat und 96 % Äthanol hinzugegeben.
Nach der Alkoholfällung wurden ungefähr 12 % der markierten Verbindungen in 20 µl H_2O gelöst und auf zwei Ansätze verteilt, in einem davon erfolgte dann die Dephosphorylierung mit 25 Units KIAP, der zweite wurde ohne Enzym nur im Puffer inkubiert.
Als Kontrolle der Reaktion dienten zwei zusätzliche Ansätze mit $[^{32}P]$ Poly(A)hnRNA, die nicht aus der T_4RNA-Ligase-Reaktion stammte.
Von allen Ansätzen wurde 2 x 1 µl auf Whatman-GF/C-Filter pipettiert und nachfolgend die aufgetragene Radioaktivität in Bray's Lösung als Medium gemessen. 2 x 10 µl von jedem Ansatz wurden mit DNA zu 10%iger TCA gegeben (siehe auch 4.2., Punkt 5).

5.4. Ergebnisse

5.4.1.

Von der in Form von [^{32}P]-MS2-RNA-Fragmenten eingesetzten Aktivität (4 x 10^6 cpm) erschienen nach der Reaktion 99 % (3,95 x 10^6 cpm) in der H_2O-Phase der Phenolextraktion, dagegen enthielt der wässrige Überstand des unvollständigen Ansatzes (ohne Akzeptor) nur 15 % (0,6 x 10^6 cpm) der Ausgangsaktivität.

Im Autoradiogramm zeigten die Banden im Bereich der reaktionsfähigen Probe eine deutliche Musterveränderung im Vergleich zu denen der [^{32}P]-MS2-RNA-Fragmente und denen des unvollständigen Ansatzes.

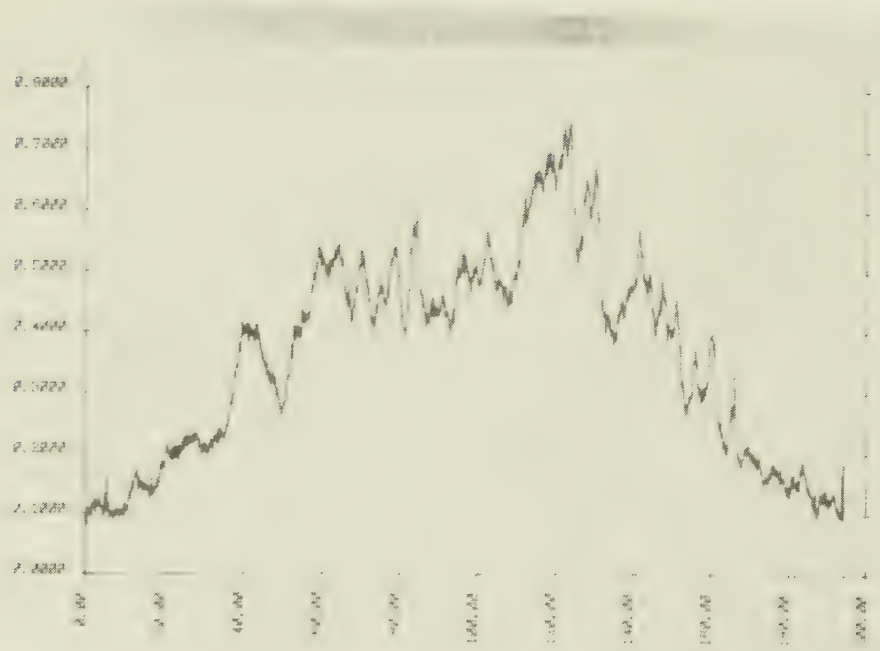
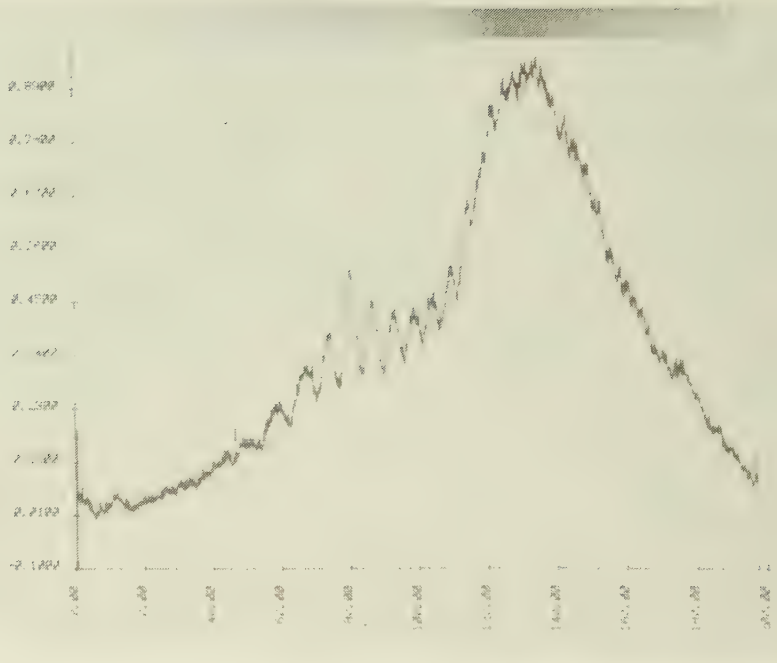


Abb. 1, a und b:
Photometrische Auswertung der Autoradiogramme von $[^{32}P]$-MS2-RNA-Fragmenten.
a) $[^{32}P]$-MS2-RNA-Fragmente



b) $[^{32}p]$-MS2-RNA-Fragmente nach der T_4RNA-Ligase-Reaktion mit $r(A)_{12-18}$-Molekülen als Akzeptoren

5.4.2.

Von der eingesetzten [^{32}P]-Poly(A)hnRNA (Aktivität 5,5 x 10^6 cpm) enthielt die H_2O-Phase der Phenolextraktion 53,5 % (2,94 x 10^6 cpm).

Die zur [^{32}P]-Resistenz gegen KIAP erhaltenen Ergebnisse wurden in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Probe	1.	2.	3.	4.
T_4RNA-Ligase-Reaktion	+	+	-	-
KIAP-Spaltung	+	-	+	-
Aktivität 100 %* [cpm]	6,8 x 10^4	7,6 x 10^4	11 x 10^4	11 x 10^4
TCA fällbare Aktivität [cpm];(%)	2,97 x 10^4 (43,7)	5,76 x 10^4 (75,8)	0,38 x 10^4 (3,5)	8,18 x 10^4 (74,4)

Nach der Berücksichtigung des unspezifischen Radioaktivitätsverlustes im Durchschnitt von 25 % (Probe 2. und 4.) und der nach KIAP-Spaltung des freien [^{32}P] am 5'-Ende der Poly(A)hnRNA noch vorhandenen Aktivität von 3,5 % (Probe 3.) ergibt sich für Probe 1. ein Wert von ungefähr 65 %, d.h. insgesamt beträgt die Ausbeute dieser T_4RNA-Ligase-Reaktion nach Abzug der Verluste bei der Phenolextraktion ungefähr 35 %.

* Die nach der Spaltung mit KIAP bzw. nach der Inkubation in ihrem Puffer für 1 µl Ansatzvolumen gemessenen Werte der Radioaktivität wurden mit zehn multipliziert und als Ausgangsaktivität (100 %) der aus 10 µl Ansatzvolumen mit 10 % TCA fällbaren markierten Verbindungen eingesetzt.

5.5. Diskussion

Wie bereits erwähnt, spielen bei den intermolekularen Reaktionen mit der T_4RNA-Ligase die molaren Verhältnisse der Reaktionsteilnehmer eine wichtige Rolle.

Bei ihrer Wahl wurden folgende Grundsätze befolgt:

1. Kann der Donor nicht in entsprechend hoher Konzentration eingesetzt werden, ist das Verhältnis Akzeptor/Donor anzuheben.

2. Verursacht ein Reaktionsteilnehmer eine Effizienzabnahme, sei es durch seine Konzentration oder seinen Aufbau, ist die Enzymmenge im Ansatz zu erhöhen.

3. Bei der ATP-Zugabe ist in erster Linie das Verhältnis ATP/Enzym zu beachten.

Durch das Befolgen der unter 1. bis 3. angegebenen Regeln konnte in dem Ansatz mit Poly(A)hnRNA, die in einer Konzentration von 0,12 µMol/l vorlag, doch noch eine Reaktionsausbeute von 35 % erreicht werden.
Die molaren Verhältnisse der Ansätze lagen in folgenden Bereichen:

1. MS2-RNA ; $r(A)_{12-18}$		2. Poly(A)hnRNA; $d(N)_7r(A)_3$
Akzeptor	: Donor ≈ 63 : 1	≈ 783 : 1
Enzym	: Donor ≈ 4 : 1	≈ 24 : 1
ATP	: Donor ≈ 563 : 1	≈ 3261 : 1
ATP	: Enzym ≈ 150 : 1	≈ 139 : 1

Im Rahmen des cDNA-Verfahrens sind die für die MS2-RNA aufgeführten Verhältnisse zu empfehlen; sie wurden nicht eingehalten, weil der Einsatz von 10-20 pMol Poly(A)hnRNA zu Testzwecken nicht lohnend erschien.

Zum Nachweis der Reaktionsausbeuten über die $[^{32}P]$-Resistenz gegen KIAP ist folgendes zu sagen:

Bei den Ansätzen mit der MS2-RNA, mit und ohne Akzeptor, konnte gezeigt werden, daß der Donor an das Enzym gebunden und vor Abschluß der vollständigen Reaktion kaum freigesetzt wird (siehe Ergebnisse der Phenolextraktionen).

Daraus ist zu folgern, daß in einem Ansatz mit Poly(A)hnRNA, dem Akzeptor in hohem Überschuß und unverändertem Verhältnis von ATP/Enzym die Freisetzung des aktivierten Donors erst recht unwahrscheinlich erscheint.
(Auch hier wurde die Bindung des Donors an das Enzym durch das unvollständige Erscheinen der eingesetzten Radioaktivität in der H_2O-Phase der Phenolextraktion angezeigt).

5.6. ANHANG II

5.6.1. Partielle Spaltung der RNA vom Bakteriophagen MS2 mit der Ribonuclease T_1

Da diese Reaktion bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben wurde (22.; 23.; 26.; 27.; 39.und 53.)soll hier nur folgendes angeführt werden:

1. Die genomische RNA des Phagen besteht aus 3600 Basen und weist im nativen Zustand eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf.

2. Die Ribonuclease T_1 spaltet einzelsträngige RNA und gehört zu den Guanin-spezifischen RNasen.

3. Die Reaktion wurde mit jeweils 5 µg MS2-RNA pro Ansatz unter Zugabe verschiedener Enzymmengen: 1; 1,2; 1,8; 3,5 und 0,018; 0,023; 0,035; 0,046; 0,07; 0,14; 0,175; 0,23; 0,28 [Units] getestet und die Spaltprodukte elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. 2).

4. Die Ergebnisse der unter Punkt 3. genannten Reaktionen wurden zur Spaltung der MS2-RNA für die T_4RNA-Ligase-Reaktion verwendet. Zur Gewinnung von Spaltprodukten (Länge 20-70 Nucleotide) wurde folgendes Enzym-Substrat-Verhältnis eingesetzt:
   1 Unit RNase T_1/5 µg MS2-RNA

   In der Reaktion wurden 600 µg MS2-RNA gespalten, nach elektrophoretischer Auftrennung und Gelelution wurden 90 µg (15 %) der eingesetzten RNA als Fragmente mit richtiger Länge erhalten.

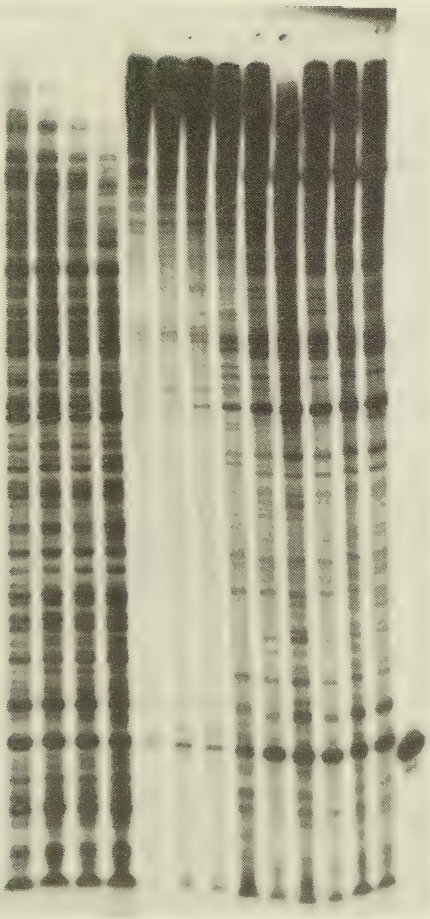


Abb. 2
Autoradiogramm von $[^{32}P]$-MS2-RNA nach partieller Spaltung mit der Ribonuclease T_1.
Von links nach rechts Spaltung mit: 1; 1,2; 1,8; 3,5; 0,018; 0,023; 0,035; 0,046; 0,07; 0,14; 0,175; 0,23; 0,28 Units Enzym; rechter Bildrand - Längenstandard: $(N)_{20}$

5.6.2. Anwendung der Oligo(dT)Cellulose zur Abtrennung der ungebundenen $d(N)_7r(A)_3$ Moleküle nach der T_4RNA-Ligase-Reaktion

Das Oligonucleotid wird in der genannten Reaktion im Überschuß eingesetzt, wenn es nachfolgend nicht ausreichend eliminiert wird, kann es später an das Plasmid binden und so die Effizienz der Ligation von Poly(A)RNA senken.

5.6.2.1. Einführung

Zur Chromatographie unter Anwendung der Oligo(dT)Cellulose stehen Daten aus zahlreichen Arbeiten zur Verfügung (5.; 8.; 19.; 41.), deshalb werden hier nur einige Angaben zu den Eigenschaften und der Verwendung des genannten Gels zusammengefaßt.
Bei niedrigen Temperaturen (um 4° C) werden AMP-Polymere ab einer Mindestlänge von $(A)_{8-10}$ an das Gel gebunden, bei Raumtemperatur ab $(A)_{20}$.

Die Bindungskapazität liegt in der Regel zwischen 1,2 und 24 nMol Poly(A) pro 1 g Oligo(dT)Cellulose.

Nach der Hydratation ergibt 1 g Gelpulver ein Volumen von ungefähr 4 ml.

Zum Auswaschen der nicht bindenden Moleküle werden 3-4fache Gelvolumina an Puffer benötigt, zur Elution der gebundenen Fraktion 3-5fache.

Die Bindungspuffer sind durch hohe Salzkonzentrationen gekennzeichnet; folgende werden zum Beispiel eingesetzt.

1. 0,5 M NaCl; 0,02 M Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 % $NaDodSO_4$;

2. 0,5 M KCl; 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5)

Die gebundenen Moleküle werden mit Tris-Puffer ohne Zusatz von Salzen oder einfach mit H_2O eluiert.

Die benutzten Gele können mit 0,1 M NaOH (KOH) regeneriert und in H_2O (0,02 % NaN_3) im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die unspezifische Bindung an Oligo(dT)Cellulose liegt bei 20-30 % der Probe, auch wenn die Bindungskapazität unterschritten wird [0,0024 pMol Poly(A)/1 mg Cellulose].

5.6.2.2. Methoden

Um die gebrauchten Informationen zu erhalten, wurde die Bindung von $[^{32}P]$-Poly(A)hnRNA an die Oligo(dT)Cellulose getestet und das Verhalten von $[^{32}P]$-$d(N)_7r(A)_3$ auf dem Gel untersucht.

In beiden Fällen diente eine mit Quarzwolle verschlossene Pasteurpipette als Säule und 50 mg Cellulosepulver wurden nach Hydratation, Waschen und Äquilibrierung mit

dem Bindungspuffer [0,5 M NaCl; 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5)] als Gel eingesetzt. Das Gelvolumen betrug 200 µl, die Elution der gebundenen Moleküle erfolgte mit H_2O.

Die erste Probe entsprach:

0,12 pMol $[^{32}P]$-Poly(A)hnRNA mit einer Aktivität von $3,2 \times 10^5$ cpm; die zweite: 10 pMol $[^{32}P]$-$d(N)_7r(A)_3$ (Aktivität 2×10^5 cpm).

5.6.2.2.1. Bindung der $[^{32}P]$-Poly(A)hnRNA an die Oligo(dT)Cellulose

Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit dem Bindungspuffer gewaschen und dieser dann in zwei Portionen aufgefangen (800 µl und 500 µl).

Zur Elution wurden folgende Volumina an H_2O eingesetzt:

400 µl; 650 µl; 300 µl.

Von allen Fraktionen (Puffer wie H_2O) wurden jeweils 100 µl abgenommen und ihre Radioaktivität in Bray's-Lösung im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

5.6.2.2.2. Verhalten von $[^{32}P]$-$d(N)_7r(A)_3$ auf der Oligo(dT)Cellulose-Säule

Zur Durchführung siehe 5.6.2.2.1.

Die Volumina der einzelnen Fraktionen betrugen:

für Puffer : 1 ml und 400 µl;

für H_2O : 800 µl.

5.6.2.3. Ergebnisse

5.6.2.3.1.

Für die Radioaktivität der aufgefangenen Fraktionen ergaben sich folgende Werte:

1. Pufferfraktionen : 2×10^4 cpm (26,3 %) und $0,7 \times 10^4$ cpm (2 %); Summe $9,1 \times 10^4$ cpm (28,4 %)

2. H_2O-Fraktionen : 2×10^4 cpm (6,3 %); $11,2 \times 10^4$cpm; (35 %) und $1,2 \times 10^4$ cpm (3,8 %); Summe $14,4 \times 10^4$ cpm (45 %)

Die Summe der Werte 1. und 2. ergibt die von der Säule zurückgewonnene Radioaktivität, diese entspricht $2,35 \times 10^5$ cpm, also 73,4 % der aufgetragenen Probe. Setzt man den letzten Wert gleich 100 %, ergibt sich folgende Verteilung der Radioaktivität: 38,7 % im Puffer; 61,3 % im H_2O enthalten.

5.6.2.3.2.

Radioaktivität der Pufferfraktionen: $13,6 \times 10^4$ cpm (68 %) und $0,8 \times 10^4$ cpm (4 %); Summe $14,4 \times 10^4$ cpm (72 %); der H_2O-Fraktionen: $0,2 \times 10^4$ cpm (1 %).

Insgesamt wurden also 73 % ($14,6 \times 10^4$ cpm) der aufgetragegen Radioaktivität zurückgewonnen, wovon 98,6 % im Puffer enthalten waren.

5.6.2.4. Diskussion

Die Ergebnisse des ersten Versuchs - mit Poly(A)hnRNA - zeigten, daß diese entweder fragmentiert oder - wahrscheinlicher - mit anderen Nucleinsäuren verunreinigt ist. Die zweite Annahme liegt aus folgenden Gründen näher: Die Poly(A)hnRNA wurde nach der Präparation der gesamten nucleären RNA an die Oligo(dT)Cellulose gebunden, eluiert und nach Zugabe vom Bindungspuffer erneut an das gleiche Gel gebunden. Der zweite Durchgang entsprach einer Abtrennung von noch vorhandenen Poly(A)$^-$ Verbindungen und zeigte, daß die zuerst gewonnene Poly(A)hnRNA noch stark verunreinigt war, so erscheint also ein dritter Gel-Durchgang empfehlenswert.
Die Anwesenheit von Poly(A)hnRNA-Fragmenten würde zum Beispiel für eine Kontamination mit Ribonucleasen sprechen; wären diese jedoch anwesend, ergäbe sich beim Arbeiten unter Raumtemperatur in kurzer Zeit eine viel stärkere Destruktion der RNA, dieses war jedoch nicht der Fall.

Beim zweiten Versuch zeigte sich, wie erwartet, daß das Oligonucleotid - $d(N)_7r(A)_3$ - nicht an die Oligo(dT)Cellulose bindet.

Bei der Verwendung des Gels zur Trennung des noch freien $d(N)_7r(A)_3$ vom Reaktionsprodukt und der Poly(A)hnRNA nach der T_4RNA-Ligase-Reaktion ist in erster Linie wichtig, daß die H_2O-Fraktion möglichst frei vom Oligonucleotid wird, dieses läßt sich sicherlich erreichen.

6. REVERSE TRANSKRIPTION (EINFÜHRUNG ZUM VERSUCHSTEIL)

Der Reaktionsmechanismus wurde schon zum Teil in der Einleitung beschrieben. Hier soll in erster Linie auf die Anwendung der sogenannten zufälligen 'primer'Moleküle eingegangen werden, damit gemeint sind oligomere Fragmente genomischer DNA nach Spaltung mit Desoxyribonuclease I.
Es handelt sich um eine Mischung verschiedener Moleküle.
Für Hexanucleotide ergeben sich zum Beispiel 4^6 = 4096 mögliche Sequenzen. In einem pMol = 6 x 10^{11} Molekülen solcher DNA-Oligomere würde jedes einzelne Oligomer in 1,5 x 10^8fachen Kopienzahl vorliegen.

Bei Verwendung kurzer Startermoleküle ist zu beachten, daß ihre komplementären Sequenzen in einem Gemisch verschiedener RNA- oder DNA-Moleküle häufig vertreten sind.
Bei einer 'primer' Länge von 15 Nucleotiden (77.) wiederholt sich die Sequenz nach 1,5 x 10^{10} Basen (haploides Genom einer eukaryoten Zelle besteht aus ungefähr 3 x 10^9 Basenpaaren).

Isolierte Poly(A)RNA enthält durchschnittlich 10^4 verschiedene Moleküle. Vereinfacht man die Rechnung durch die Annahme, daß jedes RNA-Molekül in gleicher Kopienzahl vorkommt, ergibt sich: in 1 pMol Poly(A)RNA ist jede Ribonucleinsäure in 6 x 10^7 Kopien vorhanden.
10^4 verschiedene RNAs mit 1500 Nucleotiden/RNA ergeben insgesamt 1,5 x 10^7 Mononucleotide oder 2,5 x 10^6 Hexanucleotide mit 600 Kopien pro mögliches Hexamer.
Für 1 pMol Poly(A)RNA ergeben sich so 3,6 x 10^{10} Kopien pro ein bestimmtes Hexanucleotid.

Mit $1,5 \times 10^8$fachem Vorkommen jedes Hexamers in einem pMol des $d(N)_6$ Gemisches folgt: für $3,6 \times 10^{10}$ Kopien/Hexanucleotid sind 240 pMol des Gemisches notwendig.
Will man also, daß im Ansatz zu jeder RNA-Sequenz aus sechs Basen ein komplementäres Hexanucleotid vorliegt, werden für 1 pMol mRNA 240 pMol von Hexameren benötigt.
Mit dem Verhältnis der Molekulargewichte mRNA : $d(N)_6 \approx$ $\approx$250 : 1 folgt: mengenmäßiger Einsatz der Moleküle $\approx$ $\approx$1 : 1 [µg/µg].
Für eine effiziente Hybridisierung wird ein Überschuß an 'primer'Molekülen benötigt:
Molares Verhältnis $(dT)_{12-18}$: Poly(A)RNA $\geq$ 8 : 1 (**83.**; **84.**; **45.**;); $(dN)_{4-10}$: Poly(A)RNA = 27 : 1 [µg/µg] (**84.**)

6.1. Reverse Transkription mit Poly(A)hnRNA als Matrize und Hexanucleotiden als zufällige 'primer'Moleküle

Puffer (Endkonzentrationen angegeben):
50 mM Tris-HCl (pH 8,3); 8 mM $MgCl_2$; 50 mM KCl; 4 mM DTT.
2 µg Poly(A)hnRNA wurden mit jeweils 70 nMol dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 81 pMol [α-^{32}P] dCTP; 5 µg Actinomycin D; 5 Units RNase-Inhibitor; 50 nMol Hexanucleotide und 20 Units AMV reverse Transkriptase, 75' bei 37° C inkubiert (Endvolumen 100 µl).
Nach Ablauf der Reaktion: Fällung der RNA in.10 % TCA bei 0° C, und zwar aus 2 x 5 µl und 2 x 35 µl Ansatzvolumen; Abtrennung der säurelöslichen radioaktiven Moleküle auf Whatman-GF/C-Filtern.
2 x 5 µl wurden vor der Enzymzugabe vom Ansatz abgetrennt, die RNA mit TCA gefällt und als Leerwert für die unspezifisch auf dem Filter verbleibende Aktivität verwendet.

6.2. Ergebnisse

Die Radioaktivität der synthetisierten cDNA betrug 2,43 x 10^5 cpm, daraus folgt:

Es wurden 0,14 pMol [^{32}P] dCMP* ; 121 pMol dCMP** bzw. 484 pMol NMPs eingebaut.

Insgesamt wurden 0,16 µg cDNA synthetisiert.
Bezogen auf die eingesetzte Poly(A)hnRNA (2 µg) ergibt sich eine Reaktionsausbeute von 8 %.

---

* spezifische Aktivitat : 0,8 µCi (1,76 x 10^6 dpm)/pMol

** dCTP: [^{32}P] dCTP = 864 : 1 (entsprechendes Verhältnis lag im Ansatz vor)

6.3. Diskussion

Zufällige 'primer'Moleküle scheinen im Vergleich zu Oligo (dT)- Startermolekülen eine etwas geringere Effizienz zu haben:

'primer'	Matrize	synthetisierte cDNA*
zufällig	virale bzw. ribosomale RNA	5-20 % nach 1 h,** 50-80 % nach 3 h (78.)
Oligo(dT)	Poly(A)mRNA	10-20 % nach 1 h (46.); 18 % nach 7' (67.); 30 % (33.)

Abgesehen von der Art der 'primer'Moleküle und der Inkubationszeit sind die Syntheseraten von zugegebener Enzymmenge, Konzentrationen der NTPs im Ansatz (32.; 87.) und anderen Faktoren abhängig. Da nicht alle Faktoren hier berücksichtigt wurden, sind die angegebenen Zahlen nicht direkt miteinander vergleichbar und sollen nur als Überblick dienen.

Die von den meisten Autoren eingesetzten kurzen Reaktionszeiten sind wahrscheinlich wegen der Ribonuclease H Aktivität der reversen Transkriptase erforderlich (siehe Einleitung). Das Enzym kann bei Verwendung von Oligo(dT)-Molekülen als 'primer' zur Spaltung der hybridisierten r(A)-Ketten an den 3'-Enden der RNA-Moleküle führen (Voraussetzung: letztes rAMP gepaart mit dTMP).
Es entstehen dann RNA-Oligomere, 2-8 Nucleotide lang (47.) und es kann zur Ablösung restlicher (nicht hybridisierter) mRNA kommen, die dann ein neues 'primer'Molekül braucht.

* 100 % entsprechen der Menge der als Matrize eingesetzten RNA.

** Inkubationszeit der Ansätze

Bei Verwendung von zufälligen 'primer'Molekülen kann die RNA - im fertigen RNA·DNA-Hybrid - von ihrem 5'-Ende aus exonucleolytisch gespalten werden und der nicht abgelesene Abschnitt der Ribonucleinsäure (von der Bindungsstelle des 'primer'Moleküls aus in Richtung 3'-Ende der RNA) von dem hybridisierten getrennt werden.

Normalerweise ist die reverse Transkription schneller als die exonucleolytische Spaltung. Dieses gilt jedoch nur dann, wenn keine Behinderungen der cDNA-Synthese, wie sie zum Beispiel durch geringe Ansatzkonzentrationen an NTPs oder durch Sekundärstrukturen in der mRNA möglich sind, vorkommen.

[Der in der beschriebenen Reaktion eingesetzte RNase-Inhibitor ist gegen die Ribonuclease A wirksam (9.; 17.; 18.; 65.), ob auch gegen andere RNasen ein Schutz vorliegt, ist mir nicht bekannt] .

7. MODIFIZIERTES cDNA-SYNTHESEVERFAHREN

7.1. Einführung

Die meisten Schritte des Verfahrens wurden im vorhergehenden Teil der Arbeit beschrieben; zum besseren Verständnis des nachfolgenden Schemas (siehe 7.2.) bleibt hier noch folgendes zu vermerken:

1. Das in der T_4RNA-Ligase-Reaktion als Akzeptor eingesetzte Oligonucleotid - $d(N)_7r(A)_3$ - besitzt folgende Sequenz:
   5'-d(TCGAGGCrArArA)- 3'; nach der Hybridisierung mit einem zweiten Oligonucleotid: 5' -d(pTTTGCC)- 3' entspricht die entstehende Sequenz der, die nach Spaltung mit der Xho I Endonuclease gebildet wird.

2. Vektor-Vorbereitung:

   1. Spaltung mit den Restriktionsenzymen Xho I und Kpn I.

   2. Exonucleolytische Spaltung des an der Kpn Spaltstelle vorstehenden DNA-Stranges.
      [Die Poly(A)Sequenz der RNA-Moleküle soll über ein DNA-Fragment an den Vektor gebunden werden.

      Es handelt sich dabei um einzelsträngige DNA mit folgendem Aufbau: 5' -$d(N)_{20}d(T)_{30}$-3'.

      Die Sequenz von dem $d(N)_{20}$-Abschnitt entspricht der von der exonucleolytisch gespaltenen Vektor-DNA].

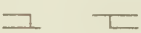
3. Im Schema verwendete Zeichen:

Poly(A)RNA

5' -d(TCGAGGCrArArA) -3'

5' -d(pTTTGCC)- 3'

5' -d$(N)_{20}$d$(T)_{30}$ -3'

Vektor ** 

cDNA .....

---

* entspricht der 'cap'Struktur

** nur die Enden werden dargestellt

7.2. Schema zum modifizierten cDNA-Syntheseverfahren

1. 'cap'Spaltung mit der T_4Polynucleotid-Kinase

2. T_4RNA-Ligase-Reaktion mit $d(N)_7r(A)_3$ als Akzeptor

3. Oligo(dT)Cellulose-Abtrennung des ungebundenen $d(N)_7r(A)_3$

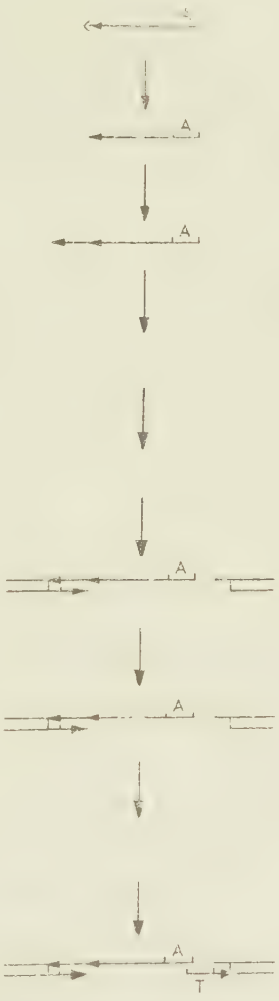
4. Phosphorylierung des 5'-Endes vom gebundenen Oligonucleotid

5. Hybridisierung mit dem zweiten Oligonucleotid; Ligation in die Xho I Spaltstelle des Vektors

6. Reverse Transkription mit Hexanucleotiden als zufällige 'primer'Moleküle

7. Abtrennung freier Hexanucleotide

8. Hybridisierung mit $d(N)_{20}d(T)_{30}$; reverse Transkription mit (dT) als 'primer'



7.3. Diskussion

Anmerkung:

Der hier erwähnte Vektor wird im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit (M. WENDE) konstruiert und steht jetzt kurz vor seiner Fertigstellung; aus diesem Grund wurde das Verfahren als Ganzes noch nicht getestet.
(Die im vorhergehenden Teil der Arbeit nicht aufgeführten Schritte gehören, für sich allein gesehen, zu Standardmethoden).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, war das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines Verfahrens zur reversen Transkription von Poly(A)RNA unter Schutz gegen die exonucleolytische Spaltung (Ribonuclease H Aktivität der reversen Transkriptase).
Die in Schritt 6. des entwickelten Verfahrens ablaufende cDNA-Synthese findet unter den geforderten Bedingungen statt, denn:

1. Das 5'-Ende der Poly(A)RNA ist über $d(N)_7r(A)_3$ als Zwischenstück kovalent an die Vektor-DNA gebunden.

2. Das 3'-Ende der Poly(A)RNA liegt einzelsträngig* vor.

In diesem Schritt (6.) soll die hauptsächliche cDNA-Synthese (lange Inkubationszeit) stattfinden, die in Schritt 8. wiederholt durchgeführte reverse Transkription soll nur wenige Minuten lang laufen. [Ablesen des 3'-terminalen Abschnittes der Poly(A)RNA].

---

* Innerhalb der verschiedenen Hexanucleotide kommen auch $d(T)_6$-Sequenzen vor, 16-33 solcher Moleküle könnten theoretisch an ein einziges Poly(A)Ende der RNA binden; die Wahrscheinlichkeit für eine endständige Bindung (Hexanucleotid am 3'-Ende der RNA) ist gering.

Es sei noch einmal betont, daß die Hexanucleotide als zufällige 'primer' an beliebige Stellen der RNA-Moleküle binden können und damit die Chancen für die reverse Transkription der 5'-terminalen Abschnitte der RNA-Moleküle genauso groß sind wie für jeden anderen Bereich.

In den sonst üblichen Verfahren liegen zur Zeit der cDNA-Synthese folgende Strukturen vor:
(verwendete Zeichen siehe unten*)

1. LAND, 1981 (45.)

2. OKAYAMA, 1982 (59.)

Im ersten Fall ist die endständige Bindung des 'primer' Moleküls - $d(T)_{12-18}$ - an das Poly(A)-Ende der RNA relativ unwahrscheinlich, so daß das 3'-Ende des Moleküls ganz gut vor der Ribonuclease H Aktivität der reversen Transkriptase geschützt ist.

---

* Poly(A)RNA mit der 'cap'Struktur an ihrem 5'-Ende

$d(T)_{12-18}$

cDNA .....

Vektorenden mit $d(T)_{60-80}$

Im zweiten Fall hingegen - $d(T)_{60-80}$ - ist die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung und somit der exonucleolytischen Spaltung am 3'-Ende der Poly(A)RNA-Moleküle sehr groß.

In beiden Fällen (1. und 2.) tragen die 5'-Enden der Poly(A)RNA-Moleküle 'cap'Strukturen, in welchem Ausmaß letzte einen Schutz gegen die Ribonuclease H Aktivität der reversen Transkriptase gewährleisten, ist unbekannt.

Mit Hilfe des dargestellten Verfahrens sollen in nächster Zeit Genbanken angelegt werden.
Schaut man sich die Ergebnisse der zur Zeit verwendeten cDNA-Klonierungsmethoden an, stellt man fest, daß der Weg zum effizienten Arbeiten noch weit ist. Ich hoffe, daß die Einführung der cDNA-Synthese unter Schutz der RNA gegen die exonucleolytische Spaltung ein Schritt auf diesem Weg sein wird.

Beispiel zur Effizienz von cDNA-Klonierungsverfahren:

Ausgehend von 5 pMol, also 3×10^{12} Molekülen Hämoglobin-mRNA erhält man von 10^5 positiven Klonen*, 10^4 mit kompletter α- oder β-Globin-Sequenz (59.). Verwendet man diese Zahlen für die durchschnittlich 10^4 verschiedenen mRNAs, die in niedriger Kopienzahl (ungefähr 15) von eukaryoten Zellen produziert werden, stünden am Start des cDNA-Klonierungsverfahrens bereits mindestens 2×10^{15} Moleküle, also 3,3 nMol mRNA.
In Wirklichkeit wäre noch viel mehr Ausgangsmaterial erforderlich, denn die durchschnittliche Länge von Poly(A)mRNA-Molekülen liegt bei 1500 Nucleotiden und die von Hämoglobin-mRNA bei nur 600.

---

* Bakterien enthalten das Plasmid plus DNA mit Hämoglobin codierenden Sequenzen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham, K.A., Lillehaug, J.R. (1976). FEBS Lett. 71, 49-52

2. Abraham, K.A., Pihl, A. (1977). Eur. J. Biochem. 77, 589-593

3. Anderson, C.W., Straus, J.W., Dudock, B.S. (1983). Methods Enzymol. 101, 635-644

4. Austoker, J., Cox, D., Mathias, A.P. (1972). Biochem. J. 129, 1139-1145.

5. Aviv, H., Leder, P. (1972). Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 1408-1412

6. Balázs, R., Hajós, F., Johnson, A.L., Reynierse, G.L.A., Tapia, R., Wilkin, G.P. (1975). Brain Res. 86, 17-30

7. Bantle, J.A., Hahn, W.E. (1976). Cell 8, 139-150

8. Bantle, J.A., Maxwell, I.H., Hahn, W.E. (1976). Anal. Biochem. 72, 413-427

9. Blackburn, P., Wilson, G., Moore, S. (1977). J.Biol. Chem. 252, 5904-5910

10. Blomstrand, C., Hamberger, A. (1970). J. Neurochem. 17, 1187-1195

11. Blomstrand, C., Hamberger, A. (1969). J. Neurochem. 16, 1401-1407

12. Braak, H., Architectonics of the Human Telencephalic Cortex, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1980

13. Brennan, C.A., Manthey, A.E., Gumport, R.I. (1983). Methods Enzymol. 100, 38-52

14. Brodal, P. (1972). Brain Res. 39, 297-317

15. Brown, I.R. (1980). Develop. Biol. 80, 248-252

16. Burdman, J.A. (1970). J. Neurochem. 17, 1555-1562

17. Burton, L.E., Fucci, N.P. (1982). Int. J. Peptone Protein Res. 19, 571-579

18. Burton, L.E., Blackburn, P., Moore, S. (1980). Int. J. Peptide Protein Res. 16, 359-364

19. Chikaraishi, D.M. (1979). Biochemistry 18, 3249-3256

20. Cohen, J., Mareš, V., Lócin, Z. (1973). J. Neurochem. 20, 651-657

21. Deng, G., Wu, R. (1983). Methods Enzymol. 100, 96-116

22. De Wachter, R., Merregaert, J., Vandenberghe, A., Contreras A., Fiers, W. (1971). Eur. J. Biochem. 22, 400-414

23. De Wachter, R., Fiers, W. (1971). Methods Enzymol. 21, 167-178

24. Efstratiadis, A., Vournakis, J.N., Donis-Keller, H., Chaconas, G., Dougall, D.K., Kafatos, F.C. (1977). Nucl. Acids Res. 4, 4165-4174

25. Ellenberger/Baum, Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere, Springer-Verlag, Berlin, 1977

26. Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G., Ysebaert, M. (1976). Nature 260, 500-507

27. Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Merregaert, J.,Min Jou, W., Raeymaekers, A., Volckaert, G., Ysebaert, M., Van de Kerckhove, J., Nolf, F., Van Montagu, M. (1975). Nature 256, 273-278

28. Gilboa, E., Mitra, S.W., Goff, S., Baltimore, D. (1979). Cell 18, 93-100

29. Giuffrida, A.M., Cox, D., Mathias, A.P. (1975). J. Neurochem. 24, 749-755

30. Grouse, L.D., Schrier, B.K., Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R., Nelson, P.G. (1978). J. Neurochem. 30, 191-203

31. Hames, B.D., Perry, R.P. (1977). J. Mol. Biol. 109, 437-453

32. Haseltine, W.A., Kleid, D.G., Panet, A., Rothenberg, E., Baltimore, D. (1976). J. Mol. Biol. 106, 109-131

33. Hell, A., Young, B.D., Birnie, G.D. (1976). Biochim. Biophys. Acta 442, 37-49

34. Henshaw, E.C., Panniers, R. (1983). Methods Enzymol. 101, 616-629

35. Herman, R.C., Williams, J.G., Penman, S. (1976). Cell 7, 429-437

36. Hewish, D.R., Burgoyne, L.A. (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504-510

37. Higgins, N.P., Geballe, A.P., Cozzarelli, N.R. (1979) Nucl. Acids Res. 6, 1013-1024

38. [illegible], L.E., Joklik, W.K., Mark, G.E., Gurtoska, R.N., Taylor, J.M. (1978). J. Virol. 28, 810-818

39. Iserentant, D., Fiers, W. (1979). Eur. J. Biochem. 102, 595-604

40. Izant, J.G., Weintraub, H. (1984). Cell. 36, 1007-1015

41. Katinakis, P.K., Slater, A., Burdon, R.H. (1980). FEBS Lett. 116, 1-7

42. Kato, T., Kurokawa, M. (1967). J. Cell Biol. 32, 649-662

43. Kozak, M. (1984). Nucl. Acids Res. 12, 857-872

44. Kozak, M., Shatkin, A.J. (1979). Methods Enzymol. 60, 360-375

45. Land, H., Grez, M., Hauser, H., Lindenmaier, W., Schütz, G. (1981). Nucl. Acids Res. 9, 2251-2266

46. Land, H., Grez, M., Hauser, H., Lindenmaier, W., Schütz, G. (1983).Methods Enzymol. 100, 285-292

47. Leis, J.P., Berkower, I., Hurwitz, J. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 466-470

48. Løvtrup-Rein, H., McEwen, B.S. (1966). J. Cell Biol. 30, 405-415

49. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor , New York, 1982

50. McEwen, B.S., Plapinger, L., Wallach, G., Magnus, C. (1972). J. Neurochem. 19, 1155-1170

51. Merrick, W.C. (1983). Methods Enzymol. 101, 606-615

52. Meyuhas, O., Perry, R.P. (1979). Cell 16, 139-148

53. Min Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M., Fiers, W. (1972). Nature 237, 82-88

54. Mitra, S.W., Goff, S., Gilboa, E., Baltimore, D. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4355-4359

55. Moldave, K., Fischer, I. (1983). Methods Enzymol. 101, 629-635

56. Moldave, K., Gasior, E. (1983). Methods Enzymol. 101, 644-650

57. Ohno, T., Okada, Y., Shimotonno, K., Miura, K., Shinshi, H., Miwa, M., Sugimura, T. (1976). FEBS Lett. 67, 209-213

58. Ohtsuka, E., Nishikawa, S., Markham, A.F., Tanaka, S., Miyake, T., Wakabayashi, T., Ikehara, M., Sugiura, M. (1978). Biochemistry 17, 4894-4899

59. Okayama, H., Berg, P. (1982). Mol. Cell. Biol. 2, 161-170

60. Poduslo, S.E., Norton, W.T. (1975). Methods Enzymol. 35, 561-579

61. Ratliff, R.L. in Boyer, P.D. (Editor). The Enzymes, Vol XIV, 105-118, Academic Press, New York, 1981

62. Richardson, C.C. in Boyer, P.D. (Editor). The Enzymes, Vol. XIV, 299-314, Academic Press, New York, 1981

63. Romaniuk, P.J., Uhlenbeck, O.C. (1983). Methods Enzymol. 100, 52-59

64. Roychoudhury, R., Jay, E., Wu, R. (1976). Nucl. Acids Res. 3, 863-877

65. Scheele, G., Blackburn, P. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4898-4902

66. Schibler, U., Kelley, D.E., Perry, R.P. (1977). J. Mol. Biol. 115, 695-714

67. Seeburg, P.H., Shine, J., Martial, J.A., Baxter, J.D., Goodman, H.M. (1977). Nature 270, 486-494

68. Sellinger, O.Z., Legrand, J , Clos, J., Ohlsson, W.G. (1974). J Neurochem. 23, 1137-1144

69. Sellinger, O.Z., Azcurra, J.M. (1974). Res. Meth. Neurochem 2, 3-38

70. Shepherd, G.M., The Synaptic Organization of the Brain, Oxford University Press, New York, 1974

71. Shimotohno, K., Kodama, Y., Hashimoto, J., Miyata, K. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2734-2738

72. Shinshi, H., Miwa, M., Sugimura, T., Shimotohno, K., Miura, K. (1976). FEBS Lett. 65, 254-257

73. Sherman, F., Stewart, J.W., Tsunasawa, S. in Boyer, P.D. (Editor), The Enzymes, Vol. XV, 245-265, Academic Press, New York, 1982

74. Smith, A.J.H. (1980). Methods Enzymol. 65, 560-580

75. Snopek, T.J., Sugino, A., Agarwal, K.L., Cozzarelli, N.R. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 417-424

76. Soga, K., Takahashi, Y. (1976). J. Neurochem. 26, 89-94

77. Szostak, J.W., Stiles, J.I., Tye, B.-K., Chiu, P., Sherman, F., Wu, R. (1979). Methods Enzymol. 68, 419-428

78. Taylor, J.M., Illmensee, R., Summers, J. (1976). Biochim. Biophys. Acta 442, 324-330

79. Thomas, J.O., Thompson, R.J. (1977), Cell 10, 633-640

80. Thompson, R.J. (1973). J. Neurochem. 21, 19-40

81. Uhlenbeck, O.C., Cameron, V. (1977). Nucl. Acids Res. 4, 85-98

82. Uhlenbeck, O.C., Gumport, R.I. in Boyer, P.D. (Editor), The Enzymes, Vol. XV, 31-58, Academic Press, New York, 1982

83. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Picted, R., Tischer, E., Rutter, W.J., Goodman, H.M. (1977). Science 196, 1313-1319

84. Van Ness, J., Maxwell, I.H., Hahn, W.E. (1979). Cell 18, 1341-1349

85. Verma, I.M. (1978). J. Virol. 27, 615-620

86. Verma, I.M. in Boyer, P.D. (Editor), The Enzymes, Vol. XIV, 87-103, Academic Press, New York, 1981

87. Verma, I.M. (1977). Biochim. Biophys. Acta 473, 1-38

88. Walker, G.C., Uhlenbeck, O.C., Bedows, E., Gumport, R.I. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 122-126

89. Wilkin, G.P., Balázs, R., Wilson, J.E., Cohen, J., Dutton, G.R. (1976). Brain Res. 115, 181-199

90. Yanagihara, T., Hamberger, A. (1973). Brain Res. 59, 445-448

9. ANHANG III

9.1. Material *

Amersham
Rabbit reticulocyte lysate (nuclease treated, message dependent); [α-^{32}P]dCTP (800 Ci/mMol); [γ-^{32}P]ATP (3000 Ci/mMol); L-[^{35}S]methionine (1100 Ci/mMol).

Bethesda Research Laboratories
Oligo(dT)cellulose; tobacco acid pyrophosphatase **, EC 3.6.1.30; ØX 174 RF DNA Hae III fragments; rabbit globin mRNA.

Boehringer Mannheim
Phosphatase, alkalische aus Kälberdarm (ca. 2000 U/mg), EC 3.1.3.1.; Polynucleotid-Kinase, 3'-phosphatasefrei (>40000 Einheiten/mg), EC 2.7.1.78.

Genofit, Genève
RNasin ribonuclease inhibitor.

Life Sciences, St. Petersburg, Florida
Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase-XL (101,45 units/mg), EC - .

Pharmacia
Ribonuclease T_1 (A.oryzae) **, EC 3.1.27.3; RNA ligase-RNase and DNase free (T_4-infected E.coli) (1200u/mg), EC 6.5.1.3; oligo$(A)_{12-18}$; pd$(N)_6$.

Serva
RNA MS2.

---

* Produktbezeichnungen entsprechen Firmenangaben

** keine Angaben des Herstellers zur spezifischen Aktivität des Enzyms

9.2 Abkürzungen

AMV	'avian myeloblastosis virus'
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoäthoxyäthan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-1-piperazino]-äthansulfonsäure
KIAP	alkalische Phosphatase vom Kalb-Intestinum
KRL	Kaninchen-Retikulozyten-Lysat
$NaDodSO_4$	Natriumdodecylsulfat
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
TAP	Tabakmosaikviren acide Pyrophosphatase
TCA	Trichloressigsäure

Frau M. Wende danke ich herzlich für zahlreiche helfende Diskussionen. Dank an Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Wittig für die zur Verfügung gestellten Laborräume und die Übernahme eines Teils der Finanzierung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Cervós-Navarro danke ich für die freundliche und hilfreiche Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Blumenstock, Malgorzata, geb. 2.8.1956 in Warschau

Eltern: Dr. med. dent. Roman Blumenstock und
Helena, geb. Sadowska, Apothekerin

1963 -	1968	Grundschule Nr. 21 in Warschau
1969 -	1970	Uhland-Grundschule in Berlin
1970 -	1976	Sophie-Scholl-Oberschule in Berlin
Juni	1976	Abitur
1977 -	1983	Studium der Humanmedizin an der FU Berlin
Juli	1983	Approbation als Arzt
Seit	SS 1983	Studium der Biochemie an der FU Berlin

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☏ 3416451
Dissertationen

Berlin 1986